

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA

**A UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ADAM33 COMO UM NOVO BIOMARCADOR
PARA O CARCINOMA DE MAMA DO TIPO LOBULAR INVASIVO**

CURITIBA

2012

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA

A UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ADAM33 COMO UM NOVO BIOMARCADOR PARA
O CARCINOMA DE MAMA DO TIPO LOBULAR INVASIVO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Universidade Federal do Paraná,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Giseli Klassen

Co-orientador: Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Manica, Graciele Cristiane More

A utilização da proteína ADAM33 como um novo biomarcador para carcinoma de mama do tipo lobular invasivo. / Graciele Cristiane More Manica. – Curitiba, 2012.

78 f.: il. ; 30cm.

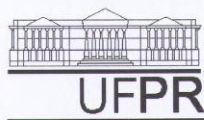
Orientadora: Giseli Klassen

Co-orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas - Cancer 2. Imunohistoquímica 3. Marcadores biológicos de tumor I. Título II. Klassen, Giseli F. III. Souza, Emanuel Maltempi IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.99249



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

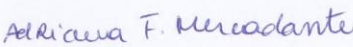
**“A UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ADAM33 COMO UM
NOVO BIOMARCADOR PARA O CARCINOMA DE MAMA
DO TIPO LOBULAR INVASIVO”**


por

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen (presidente)


Prof^a. Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante


Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens

Curitiba, 18 de outubro de 2012.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

PARECER

A banca examinadora de dissertação de Mestrado constituída pelos Professores: Prof^a. Dr^a Giseli Klassen, do Departamento de Patologia Básica/UFPR (Presidente) e a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Adriana Frohlich Mercadante do Departamento de Patologia Básica da UFPR e Maria Berenice Reynaud Steffens do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, após arguir a mestranda **GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA**, em relação ao seu trabalho de dissertação, intitulado "A utilização da proteína ADAM33 como um novo biomarcador para o carcinoma de mama do tipo lobular invasivo", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do mesmo, destacando a excelência e desenvolvimento técnico do trabalho e o mérito científico. Para a devida publicação, o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 18 de outubro de 2012.

Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen (presidente)

Prof^a. Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante

Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens

DEDICATÓRIA

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado,
ao André por toda a compreensão, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Giseli Klassen pela oportunidade de aprender a pesquisar. Obrigada pela paciência, orientação, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela atenção oferecida ao trabalho.

À CAPES e CNPq pela Bolsa de Mestrado e pelo suporte financeiro.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Aos alunos do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela disponibilidade de equipamentos e laboratórios durante a realização deste trabalho.

Ao Marco Aurelio Schuler de Oliveira, que fez parte do trabalho, com dedicação e paciência.

Ao laboratório de Patologia Experimental da Universidade Pontifícia Católica do Paraná (PUC-PR) pelo apoio na realização da técnica de imunohistoquímica deste trabalho, bem como da responsável pelo laboratório, Dra. Lucia de Noronha que auxiliou nas etapas da imunohistoquímica.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia, por sempre estarem dispostos a ajudar, por sempre abrirem a porta quando eu bato! Principalmente, pela troca de experiências e convivência.

Aos colegas que estão ou que passaram pelo laboratório de epigenética durante o mestrado. À Isabela Pereira, à Andressa Chequin, à Liliane e à Karin Braun-Prado pelas horas de descontração, pelo companheirismo e carinho.

À Ednéia Cavallieri que me ensinou com muita dedicação muitas técnicas realizadas no laboratório. Pelas conversas, pelo carinho e pelo incentivo.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em todos os momentos.

Ao meu irmão, por todo carinho e força.

Ao meu grande amor André, pelos momentos de felicidade. Seu apoio incondicional, paciência, atenção e dedicação ... Amo você!

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente no mundo, depois do câncer de pele não melanoma, e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Os carcinomas do tipo ductal e o lobular são os tipos histológicos de câncer de mama que ocorrem com maior frequência na população. Os carcinomas lobulares invasivos (CLIs) representam em torno de 10-15 % dos casos de câncer de mama, são de difícil identificação e podem ocasionar metástases para alvos pouco comuns como, por exemplo, o sistema gastrointestinal. A perda da expressão de E-caderina reflete a morfologia histológica dos CLIs, entretanto, há uma variação da expressão dessa proteína nos carcinomas lobulares (0-45%). Em um estudo recente foi determinado que o gene *ADAM33* apresenta sua expressão diminuída em CLIs devido ao silenciamento por hipermetilação do seu promotor e portanto, a proteína ADAM33 poderia ser um marcador molecular de CLIs. Com o objetivo de avaliar a utilização em imunohistoquímica da proteína ADAM33 como um biomarcador de CLIs, uma parte do gene *ADAM33* contendo o domínio rico em cisteínas foi clonado em vetor pGEM T e em seguida subclonado em vetor pET28a. A proteína recombinante foi expressa em sistema procarionte em *E. coli* BL21 Ai e purificada por cromatografia de afinidade por níquel. A proteína purificada foi utilizada para imunização de camundongos Balb-c e foi produzido soro policlonal com título de 1:25.600. Além disso, o soro policlonal apresentou especificidade para a proteína ADAM33 expressa por linhagens tumorais de mama que expressam o gene *ADAM33*. O soro policlonal apresentou também especificidade para carcinoma lobular de mama invasivo por ensaio de imunohistoquímica demonstrando, assim, a possibilidade da utilização do anticorpo anti-ADAM33 como biomarcador molecular de carcinoma de mama, mais especificamente do tipo lobular.

Palavras-chave: ADAM33, Câncer de mama, imunohistoquímica, anticorpo policlonal.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer worldwide, after nonmelanoma skin cancer, and the leading cause of cancer death among women worldwide. The histological types of breast cancer with greater frequency in the population are ductal and lobular carcinomas. The invasive lobular carcinomas (CLI) occurring around 10-15% of cases of breast cancer are difficult to identify and may cause little common targets of metastases eg, the gastrointestinal system. Loss of expression of E-cadherin histological in the CLIs reflects the morphology, however, there is a variation of protein expression in the lobular carcinomas (0-45%). In 2009, Seniski et al., determined that the ADAM33 protein may be a molecular marker of breast lobular carcinoma type, because the gene ADAM33 expression has decreased due to silencing by promoter hypermethylation in CLIs. In order to produce a marker of breast cancer, which can be used in immunohistochemistry, a part of the ADAM33 gene containing the cysteine-rich domain was cloned into vector pET28a. The recombinant protein was expressed and purified in prokaryotic systems using *E. coli* BL21 Ai. This protein was purified by affinity chromatography using a Ni²⁺ column HisTrap. Immunization of animals with recombinant ADAM33 protein produced polyclonal antiserum with a titer of 1:25.600. Furthermore, the polyclonal serum specific for the protein showed ADAM33 expressed by tumor cell lines expressing the gene ADAM33 revealing expression of protein ADAM33. The polyclonal serum also showed specificity for lobular breast carcinoma by immunohistochemistry assay thus demonstrating the possibility of using the ADAM33 protein as a molecular marker of breast carcinoma, more specifically the lobular type.

Keywords: ADAM33, breast cancer, immunohistochemistry, polyclonal antibody.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	MODELO HISTOLÓGICO DO DESENVOLVIMENTO E EVOLUÇÃO DO CÂNCER DE MAMA.....	16
FIGURA 2-	MODELO ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS ENCONTRADOS NAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM.....	22
FIGURA 3-	CLADOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE DO PROGRAMA CLUSTALW DE SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM.....	44
FIGURA 4-	ANÁLISE DE SEMELHANÇA PELO CLUSTALW DAS PROTEÍNAS ADAM19 E ADAM33.....	45
FIGURA 5-	ANÁLISE DE SEMELHANÇA PELO CLUSTALW DAS PROTEÍNAS ADAM33 HUMANA E ADAM33 DE CAMUNDONGO VARIANTE 1.....	46
FIGURA 6-	SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENE E DA PROTEÍNA ADAM33.....	49
FIGURA 7-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA ADAM33 COMPLETA.....	49
FIGURA 8-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS CLONADOS DA PROTEÍNA ADAM33.....	50
FIGURA 9-	PRODUTO DE PCR AMPLIFICADO DO GENE <i>ADAM33</i>	50
FIGURA 10-	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	51
FIGURA 11-	PCR DAS COLÔNIAS A PARTIR DOS CLONES OBTIDOS.....	51
FIGURA 12-	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS CLONES OBTIDOS.....	52
FIGURA 13-	ANÁLISE DE SEMELHANÇA PELO CLUSTALW DA SEQUÊNCIA DO GENE DA PROTEÍNA ADAM33 HUMANA (ADAM33) COM A SEQUÊNCIA RECOMBINANTE (AD33-CL04).....	53
FIGURA 14-	DIGESTÃO DO CLONE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>ECORI</i> E O PRODUTO DA PURIFICAÇÃO.....	54
FIGURA 15-	PRODUTO DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA E DNA PLASMIDIAL DO PLASMÍDEO pGM05 DIGERIDO COM <i>ECORI</i>	55
FIGURA 16-	INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>E. COLI</i> BL21 pLYSS, STAR E AI.....	57
FIGURA 17-	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM O ANTICORPO ANTI HIS –TAG.	58
FIGURA 18-	CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>E. COLI</i> BL21 AI.....	59
FIGURA 19-	GRÁFICOS DOS PRODUTOS DE PURIFICAÇÃO E PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS.....	61

FIGURA 20-	TITULAÇÃO DOS SOROS DOS 4 ANIMAIS POR ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPO.....	63
FIGURA 21-	TESTE DO SORO DO ANIMAL C3 POR WESTERN BLOTTING.....	64
FIGURA 22-	WESTERN BLOT DA PROTEÍNA ADAM33 (ACIMA) E PROTEÍNA DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA β -ACTINA (ABAIXO) NAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	65
FIGURA 23-	IMUNOHISTOQUÍMICA DE PULMÃO	67
FIGURA 24-	IMUNOHISTOQUÍMICA DE CARCINOMA DE MAMA COM O ANTICORPO POLICLONAL ANTI-ADAM33.....	69

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	DESCRIÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS, VETORES E LINHAGENS TUMORAIS UTILIZADAS NO TRABALHO.....	29
QUADRO 2-	CONCENTRAÇÃO OBTIDA APÓS AS PURIFICAÇÕES DA PROTEÍNA ADAM33 RECOMBINANTE E APÓS O TRATAMENTO COM PEG 8000.....	62
QUADRO 3-	DISTRIBUIÇÃO DOS 11 CASOS DE CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM A IDADE, ESTADIO, TIPO, ESTATUS DA EXPRESSÃO E METILAÇÃO DA ADAM33.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM - A Disintegrin And Metaloproteinase

BCL2 - B-cell CLL/lymphoma 2 Gene

BLAST - Basic Alignment Search School

CDI – Carcinoma Ductal Invasor

CDIS – Carcinoma Ductal *in situ*

cDNA - DNA complementar

CLIS – Carcinoma Lobular *in situ*

CLI – Carcinoma Lobular Invasivo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxinucleotídeo fosfato

DO600 – Densidade ótica a 600 nanômetros

EDTA - Etilenodiamino tetraacetato

EGF - Epidermal Growth Factor

EGF-*like* - Epidermal Growth Factor Like

EGFR1 - Epidermal Growth Factor Receptor 1

ERBB2 - v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

HCl - Ácido Clorídrico

HER-2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor

Kb - quilo bases

kDa - quilo Daltons

LA - Luria-Bertani Agar

LB - Luria-Bertani

MDC - Metaloproteinase-like, Disintegrin-like, Cystein-rich

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

NaCl - Cloreto de sódio

NCBI - National Center of Biotechnology Info

pb - pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

PVDF - Decafluoreto de polivinil

RE - Receptor de Estrógeno

RNA - Ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

RP – Receptor de Progesterona

RT-PCR - Reverse Transcriptase PCR

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis

SNP - Single Nucleotide Polymorphism

TDLU - Unidade Terminal ducto-lobular

TGF - Transforming Growth Factor

Tris - Tris (Hidroximetil) amino metano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 TIPOS DE CÂNCER DE MAMA.....	16
1.2 MARCADORES MOLECULARES DE CÂNCER	20
1.3 A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ADAM.....	21
1.4 A PROTEÍNA ADAM33	24
2 JUSTIFICATIVA.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E LINHAGENS TUMORAIS	29
4.2 MEIOS DE CULTURA	30
4.3 ANTIBIÓTICOS.....	30
4.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE UMA PARTE DO GENE ADAM33 EM VETOR DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	31
4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	33
4.6 EXPRESSÃO DO DOMÍNIO RECOMBINANTE DA PROTEÍNA ADAM33.....	33
4.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES.....	34
4.8 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	34
4.9 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA A PURIFICAÇÃO.....	35
4.10 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ADAM33 RECOMBINANTE	36
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	36
4.12 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS OU WESTERN BLOT	37
4.13 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS.....	38
4.13.1 Titulação dos Anticorpos policlonais	38
4.14 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI ADAM33	39
4.14.1 Western Blot de linhagens tumorais de mama	39
4.14.2 Tissue Micro Array – TMA.....	40
4.14.3 Imunohistoquímica.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 SELEÇÃO DA REGIÃO DA PROTEÍNA ADAM33 PARA CLONAGEM	43
5.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA PROTEÍNA ADAM33.....	50
5.3 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DOS CLONES	52
5.4 SUBCLONAGEM DE PARTE DO GENE ADAM33 NO VETOR DE EXPRESSÃO PET28A	53
5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INDUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	55
5.6 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI ADAM33	63
5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA COM O ANTICORPO POLICLONAL ANTI ADAM33.....	66
6 CONCLUSÃO.....	71
7 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, que envolve variações morfológicas e clínicas, sendo o resultado de alterações genéticas e epigenéticas (WEIGELT *et al.*, 2010; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010; ESWARAN *et al.*, 2012).

Esse é o tipo de câncer mais frequente no mundo entre as mulheres, depois do câncer de pele não melanoma, e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo (JEMAL *et al.*, 2011). Para o ano de 2012, foram estimados 226.870 novos casos (29 % do total) e 39.510 mortes (14% do total) decorrentes de câncer de mama nos EUA (SIEGEL *et al.*, 2012). No Brasil, o câncer de mama é a principal causa de morte entre todos os tipos de câncer em mulheres. O número de casos novos esperados para o Brasil em 2012 é de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012). As metástases são a causa de morte em 90% dos pacientes com câncer. Ainda não é possível prever o risco de desenvolvimento de metástases, no câncer de mama, por isso no momento mais de 80% das pacientes com diagnóstico de câncer recebem terapia adjuvante e apesar disso, em 40% dessas, ocorre recidiva e morte devido às metástases em um período de cinco anos (WEIGELT *et al.*, 2005).

No câncer de mama existe uma heterogeneidade que não pode ser explicada apenas por parâmetros clínicos, tais como tamanho do tumor, envolvimento dos linfonodos, grau histológico, idade, ou por biomarcadores como receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2) rotineiramente utilizadas no diagnóstico e tratamento de pacientes. A necessidade de conhecer mais sobre a doença desencadeou um grande crescimento na pesquisa sobre a biologia molecular do câncer de mama. Avanços nas tecnologias têm permitido aos pesquisadores investigar a natureza do câncer mama, revelando que essa doença requer a interligação de várias vias de sinalização e que tanto o microambiente celular, as características inatas do paciente e a fisiopatologia da doença tem influência no tempo de sobrevida e também na resposta ao tratamento (SIMPSON *et al.* 2005; VALLEJOS *et al.*, 2010; EROLES *et al.*, 2011).

1.1 TIPOS DE CÂNCER DE MAMA

O câncer da mama é subdividido em vários tipos, que diferem por sua morfologia, características moleculares e evolução clínica. Os fatores prognósticos que indicam a evolução da doença incluem grau do tumor, tamanho e proliferação (SIMPSON *et al.*, 2005; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010).

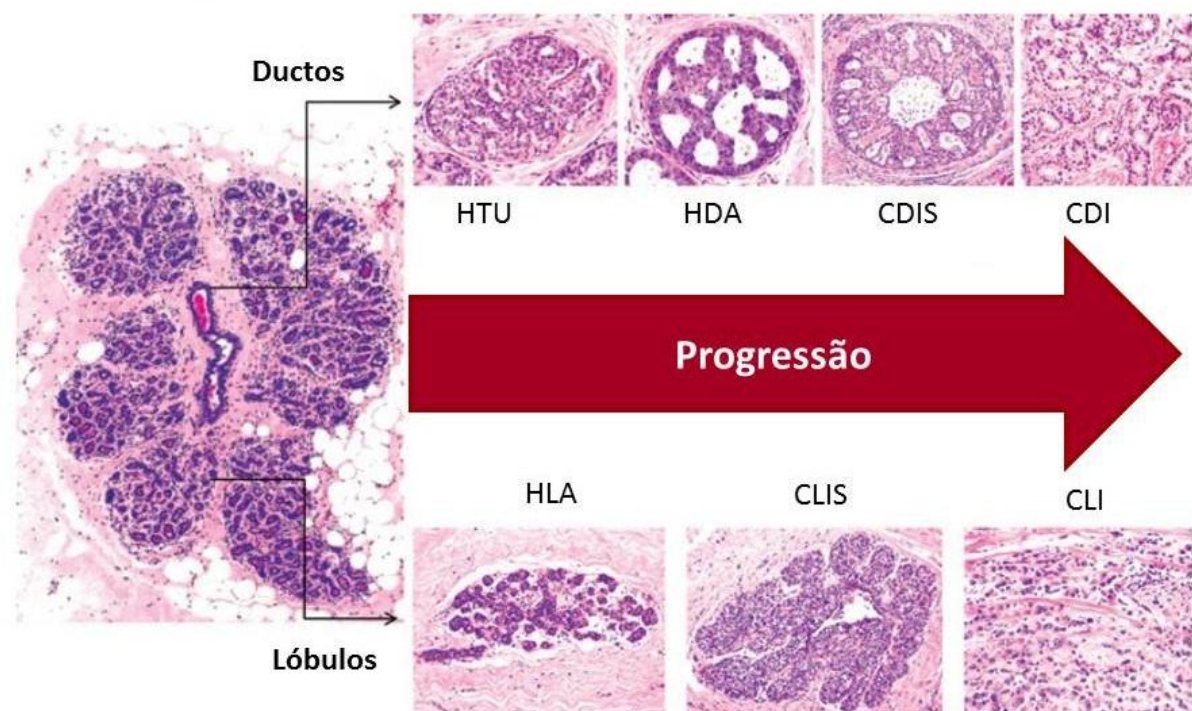


FIGURA 1 – MODELO HISTOLÓGICO DO DESENVOLVIMENTO E EVOLUÇÃO DO CÂNCER DE MAMA. HTU: hiperplasia do tipo usual. HDA: hiperplasia ductal atípica. CDIS: carcinoma ductal *in situ*. CDI: carcinoma ductal invasor. HLA: hiperplasia lobular atípica. CLIS: carcinoma lobular *in situ*. CLI: carcinoma lobular invasor.
 FONTE: Modificado de LOPEZ-GARCIA *et al.* 2010.

A maioria das malignidades mamárias, mais de 95 % são adenocarcinomas, que são divididos em carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos, demonstrados na Figura 1. O carcinoma *in situ* se refere a uma proliferação neoplásica que está limitada aos ductos e lóbulos pela membrana basal. Já o carcinoma invasivo é aquele que atravessou a membrana basal e alcançou o estroma (YODER *et al.*, 2007).

Os carcinomas do tipo ductal e o lobular são os tipos histológicos de câncer de mama mais frequentes na população, podendo se apresentar *in situ* ou invasivo (YODER *et al.*, 2007; TURASHVILI *et al.*, 2007; WEIGELT *et al.*, 2010; RAOUF *et al.*, 2012). Esses dois tipos de carcinomas são derivados das unidades terminais ducto-lobulares (TDLU) e as diferenças na morfologia são o reflexo dos mecanismos carcinogênicos (TURASHVILI *et al.*, 2007; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010; RAOUF *et al.*, 2012). A apresentação dos parâmetros clínicos patológicos tais como local do tumor, grau e tamanho são semelhantes para ambos os tipos de tumor, porém, dados clínicos e os padrões de metástases sugerem que o seu desenvolvimento e a progressão sejam diferentes. No carcinoma ductal invasivo as metástases são frequentes nos pulmões, cérebro, ossos e fígado, no entanto, no carcinoma lobular invasivo as metástases ocorrem geralmente no trato gastrointestinal, peritônio e retroperitônio (YODER *et al.*, 2007; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010; RAOUF *et al.*, 2012; CARCOFORO, RAIJI, & LANGAN, 2012). O tratamento para tumores que estejam no mesmo estágio é semelhante, mas muitas vezes o carcinoma lobular invasor é resistente à terapia adjuvante, além disso, mesmo as pacientes com mais idade, tendo tumores de baixo grau e sem comprometimento dos linfonodos, não têm sobrevida aumentada em comparação com carcinoma ductal invasivo (TURASHVILI *et al.*, 2007; YODER *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010; EROLES *et al.*, 2011; CARCOFORO, RAIJI, & LANGAN, 2012).

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) consiste em uma população clonal maligna de células limitadas aos ductos pela membrana basal (Figura 1). Representa a forma inicial, não invasiva e com bom prognóstico do carcinoma ductal. Dentre os cânceres diagnosticados por mamografia quase metade são CDIS, muitos detectados como microcalcificações, compreendendo cerca de 15% a 30% de todos os cânceres (YODER *et al.*, 2007; VIRNIG *et al.*, 2009).

O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é sempre um achado incidental de biópsia, já que não está associado à calcificação ou reações estromais que produzam densidades mamográficas, com resultado de 1% a 6% de incidência de todos os carcinomas (SIMPSON *et al.*, 2005; GOMES, BALABRAM, PORTO, & GOBBI, 2011). Esse tipo de câncer representa um fator de alto risco para o desenvolvimento do carcinoma invasor de mama (SIMPSON *et al.*, 2005; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2012).

O carcinoma ductal invasivo (CDI), correspondente a aproximadamente 75% dos carcinomas de mama, são caracterizados pela formação de túbulos ou ductos que se infiltram no parênquima mamário (YODER *et al.*, 2007; WEIGELT *et al.*, 2010).

Aproximadamente 20% dos CDIs podem ser categorizados em subtipos específicos tais como tubular, medular, mucinoso, papilar, micropapilar ou metaplásico. Cada subtipo é definido por características histopatológicas e citológicas únicas. Os 80% restantes de CDIs não são subclassificados histopatologicamente, sendo chamados carcinomas ductais “sem outra especificação” ou “nenhum tipo específico (YODER *et al.*, 2007; WEIGELT *et al.*, 2010).

O carcinoma lobular invasivo (CLI) compreende 10-15% de todos os carcinomas de mama (BIGLIA *et al.*, 2007; YODER *et al.*, 2007; KRISTIANSEN & PILARSKY, 2008; CAO *et al.*, 2012). Apresenta-se como uma massa palpável ou uma densidade mamográfica com bordos irregulares, em um quarto dos casos o tumor infiltra-se difusamente no tecido, por isso as metástases também são difíceis de detectar (YODER *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2012). Os aspectos histopatológicos que descrevem os exemplos clássicos de lesões lobulares são populações de pequenas células aberrantes com pequenos núcleos, ácinos individuais e falta de coesão entre as células. Os nucléolos geralmente não são visíveis, as mitoses são raras ou esparsas na maioria dos casos. O padrão de crescimento é distinto, com arranjo linear de células localizadas entre feixes de colágeno formando as chamadas “filas indianas” (Figura 1, CLI) (NISHIZAKI *et al.*, 1997; BANE *et al.*, 2005).

A principal característica molecular específica descrita dos carcinomas lobulares invasivos e carcinomas lobulares *in situ* é a perda ou hipo-expressão de E-caderina (*CDH1*). A variação de expressão ocorre pela combinação de perda de heterozigose, mutação gênica (NISHIZAKI *et al.*, 1997; HARIGOPAL *et al.*, 2005; KRISTIANSEN & PILARSKY, 2008) ou silenciamento do promotor por hipermetilação e que levam à inativação bialélica do gene (GRAFF *et al.*, 1995).

A expressão da E-caderina é normalmente presente nas membranas de células epiteliais em conformidade com a sua função na adesão celular. A ausência da expressão da proteína pode ser avaliada usando imunohistoquímica. Vários estudos demonstram as alterações do padrão normal de expressão da E-caderina em vários tipos de câncer humano (BERX & VAN ROY, 2001). No câncer de mama,

de um modo geral, há perda parcial ou total da expressão de E-caderina correlacionada com a perda de características de diferenciação. Considerando os dois principais subtipos histológicos de câncer mama há um padrão diferente no modo de expressão da E-caderina. O carcinoma ductal de mama, em sua maioria, apresenta nenhuma ou apenas uma forma heterogênea reduzida da expressão de E-caderina. No carcinoma lobular invasivo há uma discrepância na literatura em relação à percentagem de expressão de E-caderina (0-45%) (BANE *et al.*, 2005; BERX & VAN ROY, 2001; HARIGOPAL *et al.*, 2005; KASHIWAGI *et al.*, 2011). Isso pode estar relacionado às diferenças entre as populações estudadas, sensibilidade, especificidade dos anticorpos utilizados e variação dos diagnósticos aplicados ao carcinoma lobular (BANE *et al.*, 2005).

O restante do perfil molecular dos CLIs é distintivo, porém não é inteiramente único (NISHIZAKI *et al.*, 1997; SIMPSON *et al.*, 2005). Eles são tipicamente negativos para EGFR1 e ERBB2 e positivos para citoqueratinas 1, 5, 10 e 14, receptor de estrógeno e receptor de progesterona (YODER *et al.*, 2007). Porém, é importante observar que alguns carcinomas ductais apresentam este mesmo perfil. Estudos citogenéticos mostram que os CLIs possuem poucas alterações quando comparados com outro tipo de câncer de mama. As modificações clássicas são a perda de 16q e ganho de 1p e, em termos de números gerais de modificações, CLIs se assemelham a carcinomas ductais de grau 1 (NISHIZAKI *et al.*, 1997; BANE *et al.*, 2005).

Estudos moleculares recentes sugerem que existem outras modificações específicas e características observadas em CLIs, sendo uma delas o silenciamento do gene *ADAM33* por hipermetilação do seu promotor. A partir das características da proteína ADAM33, que serão descritas em seguida, tem sido sugerido que a ausência dessa proteína poderia auxiliar na perda de coesão entre as células nos carcinomas lobulares invasivos, nos quais o gene *ADAM33* é silenciado epigeneticamente (SENISKI *et al.*, 2009).

1.2 MARCADORES MOLECULARES DE CÂNCER

Atualmente, o diagnóstico e, também, prognóstico no câncer de mama vem sendo realizado utilizando imunohistoquímica de proteínas já bem estabelecidas como marcadores, como por exemplo, os receptores de estrógeno e de progesterona que são indicativos, inclusive, do uso de terapia hormonal (HARRIS *et al.*, 2007; GOWN, 2008; WEIGELT *et al.*, 2010; PRASAD *et al.*, 2011). Outro marcador muito importante é a proteína HER2 (produto do gene *ERBB2*) cuja marcação é indicativo de terapia específica com anticorpo monoclonal (Herceptin®)(VIANI *et al.*, 2007; YODER *et al.*, 2007). Além disso, a expressão de vários marcadores, incluindo p53 e bcl-2 tem mostrado associação com a sobrevida livre de doença (KEEN & DAVIDSON, 2003; HARRIS *et al.*, 2007; WEIGELT *et al.*, 2010; LEONG & ZHUANG, 2011).

Os receptores hormonais são proteínas nucleares expressas pelas células do epitélio mamário que controlam os efeitos do estrógeno e da progesterona. Sua positividade está associada a um menor risco de recidiva e aumento da sobrevida (KEEN & DAVIDSON, 2003; WEIGELT *et al.*, 2010). Dois terços de todos os tumores são receptor de estrógeno positivo (RE), já os tumores mais agressivos, com pouca diferenciação celular, apresentam pouca ou nenhuma expressão de RE (KEEN & DAVIDSON, 2003; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010). Os receptores de estrógeno, após ligação ao estrógeno, mudam de conformação e se ligam diretamente ao DNA, controlando a transcrição de genes específicos. A expressão gênica do RE é controlada por vários mecanismos incluindo os epigenéticos como a metilação do seu promotor e a compactação da cromatina pela acetilação/desacetilação das histonas (LEADER, WANG, FU, & PESTELL, 2006; EROLES *et al.*, 2011).

O receptor de progesterona (RP) promove a proliferação celular e pode ser expresso em tecidos normais e neoplásicos (LIU, ZE-JUN *et al.*, 2004).

O gene *ERBB2*, também denominado HER-2 ou neu, codifica para uma tirosinoquinase intracelular semelhante ao receptor de crescimento epidérmico e atua como um receptor de fator de crescimento (EROLES *et al.*, 2011). Ele está envolvido com a diferenciação, adesão e motilidade celular. A superexpressão da proteína HER2 é observada em 20% a 30% dos carcinomas invasores da mama. A informação sobre a superexpressão de HER2 é fundamental para o tratamento de

pacientes com câncer de mama (HARRIS *et al.*, 2007; EROLES *et al.*, 2011). Pacientes que superexpressam a proteína HER2 ou seja, que superexpressam o gene *ERBB2* são os que apresentam maior benefício com a terapia com o anticorpo monoclonal humanizado trastuzumab (Herceptin®). Estudos têm demonstrado a importância da superexpressão de HER2 como marcador prognóstico independente e relacionado à menor sobrevida global e tempo livre de doença (KEEN & DAVIDSON, 2003; RYU & LEE, 2012).

Apesar da grande importância dos marcadores moleculares acima descritos, não existe uma correlação entre a presença ou ausência destes para que se defina de forma segura o tipo histológico como CDI ou CLI (TURASHVILI *et al.*, 2005; YODER *et al.*, 2007). Assim sendo, a busca de novas moléculas ou biomarcadores que atuem como diferencial entre os dois tipos histológicos mais comuns de carcinoma de mama é de extrema relevância para o prognóstico da doença (TURASHVILI *et al.*, 2005; KRISTIANSEN & PILARSKY, 2008).

1.3 A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ADAM

As proteínas ADAMs fazem parte de uma família de proteínas transmembrana do tipo I, metaloproteinases dependentes de zinco e o nome refere-se aos principais domínios desta família de proteínas: o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina, sendo também denominadas de MDC (Metalloprotease /Disintegrin / Cystein-rich protein). Possuem uma estrutura comum que inclui pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, região rica em cisteínas, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), domínio transmembrana e cauda citoplasmática (Figura 2) (WOLFSBERG *et al.*, 1995; MOCHIZUKI & OKADA, 2007).

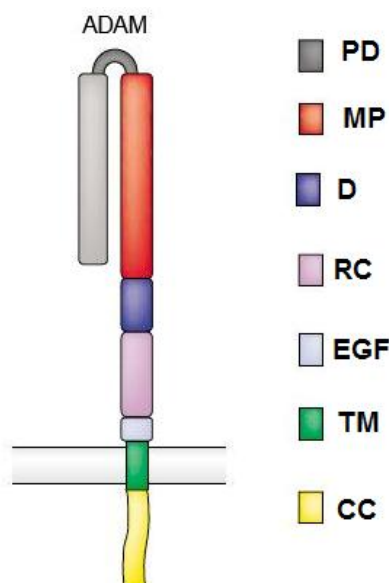


FIGURA 2 - MODELO ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS ENCONTRADOS NAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM. **PD**: pró-domínio; **MP**: domínio metaloprotease; **D**: domínio desintegrina; **RC**: domínio rico em cisteína; **EGF**: domínio semelhante a fator de crescimento epidermal; **TM**: região transmembrânica; **CC**: cauda citoplasmática.
FONTE: adaptado de WHITE, 2003.

As ADAMs estão envolvidas em diversos processos biológicos normais, tais como interações espermatozóide-óvulo, diferenciação celular, migração celular, crescimento axonal, desenvolvimento muscular e aspectos relacionados à imunidade (WOLFSBERG *et al.*, 1995; REISS & SAFTIG, 2009). O envolvimento de alguns membros da família também tem sido intensamente descrito em processos patológicos, como inflamação, artrite reumatóide, hipertrofia cardíaca, asma, Alzheimer e câncer (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; POWELL *et al.*, 2004; MOCHIZUKI & OKADA, 2007; MURPHY, 2008).

Até o momento 40 membros da família ADAM foram identificados em várias espécies como fungos filamentosos, leveduras (*Schizosaccharomyces pombe*), *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e vertebrados (DUFFY *et al.*, 2011; EDWARDS *et al.*, 2008; REISS & SAFTIG, 2009). O genoma humano contém 25 genes *ADAM*, dos quais 4 são pseudogenes (EDWARDS *et al.*, 2008).

Estas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático e seguem para maturação no Golgi, um processo de ativação dependente de protease tipo furina é comum a todas as metaloproteases, incluindo as ADAMs, o qual consiste na clivagem e remoção do pró-domínio (WHITE, 2003).

O domínio metaloprotease para ser ativo depende da presença da sequência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD. Apesar da conservação

deste sítio catalítico, a característica estrutural distinta de cada membro da família deve determinar a especificidade de seu substrato e de seus inibidores (WOLFSBERG *et al.*, 1995; REISS & SAFTIG, 2009).

Os membros ADAM 1, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 24, 26, 28, 30 e 33, que possuem a sequência consenso ativa de metaloproteases, têm um papel biológico importante no processamento (clivagem, ativação e liberação de ectodomínios) de proteínas da superfície celular (atividade de *shedase*) e proteólise de componentes da matriz extracelular (REISS & SAFTIG, 2009). Estes processos são críticos no remodelamento da superfície celular, na regulação da disponibilidade de fatores de crescimento e na modulação da capacidade das células de responderem a estímulos extracelulares (WHITE, 2003; DUFFY *et al.*, 2011). Algumas proteínas da família ADAM possuem sequências diferentes neste domínio e, apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não é ativo nestas proteínas ADAMs : 2-7, 11, 14, 16, 18, 22, 23, 27, 29 e 32 (REISS & SAFTIG, 2009). O mecanismo de atividade proteolítica tem sido intensamente investigada através do estudo da estrutura do domínio metaloprotease da ADAM17 e da ADAM33 (ORTH *et al.*, 2004; EDWARDS *et al.*, 2008).

O domínio disintegrina tem função de adesão tanto célula-célula como célula-matriz extracelular e age como ligante de integrinas na superfície celular. (WOLFSBERG *et al.*, 1995; MOHAMMED, SMOOKLER, & KHOKHA, 2003). Huang e colaboradores (2005) demonstram que distintas ADAMs podem modular a migração celular mediada por integrinas específicas sendo que pode ser um padrão imposto, ao menos em parte, por seus domínios disintegrinas, sendo de maneira independente da atividade catalítica. As ADAMs 19 e 33 inibem a migração mediada pelas integrinas $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 5 \beta 1$ (HUANG *et al.*, 2005).

O domínio rico em cisteínas tem sua função ainda pouco esclarecida. Há hipóteses de que o domínio rico em cisteínas possa regular o domínio catalítico através da ligação ao substrato, sendo assim ele pode estar envolvido na regulação da atividade biológica das ADAMs (IBA *et al.*, 2000; WHITE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008). Esse domínio também possui propriedade adesiva, podendo interagir com outros domínios ricos em cisteínas e promovendo assim, fusão de membranas celulares (WOLFSBERG *et al.*, 1995). O domínio rico em cisteínas da ADAM12 pode promover adesão através da interação com o sindecam, sendo que esta interação resulta no recrutamento de integrinas $\beta 1$ (IBA *et al.*, 2000).

A modulação da expressão de várias ADAMs já foram relatadas em diversos tipos de câncer. A expressão de RNAm das ADAMs 9, 15 e 17 estão comprovadamente aumentados no câncer de mama. ADAM12 é abundante em tecidos de carcinoma de mama e cólon (IBA *et al.*, 2000; DUFFY *et al.*, 2011).

Em resumo, a literatura destaca uma importante participação das proteínas da família ADAM nos processos de formação e progressão tumoral. Apesar disso, até o momento, poucos estudos existentes avaliam de forma sistemática o padrão de expressão gênica dos diferentes membros da família ADAM em diferentes tipos de tumores e correlacionam a expressão gênica com características do ambiente celular.

1.4 A PROTEÍNA ADAM33

A proteína ADAM33 contém todos os domínios característicos da família ADAM, incluindo a sequência consenso de ligação ao zinco no sítio catalítico, que é ativo em todas as isoformas dessa proteína. A proteína imatura de aproximadamente 120 kDa é processada a uma forma madura glicosilada de aproximadamente 100 kDa cujo domínio catalítico se torna ativo através da clivagem do pró-domínio realizada por mecanismos dependentes de catálise por furinas. A proteína ADAM33 contém 5 sítios potenciais para glicosilação, sendo, 2 sítios dentro do pró-domínio, 2 sítios no domínio catalítico e um sítio no domínio disintegrina. (GARLISI *et al.*, 2003; POWELL *et al.*, 2004). Nem todas as isoformas proteicas encontradas por Powell *et al.* (2004) se apresentam glicosiladas. Porém, uma mesma isoforma da proteína pode apresentar diferentes padrões de migração em SDS-PAGE por apresentar glicosilação diferenciada em células diferentes ou até mesmo numa única célula (GARLISI *et al.*, 2003; HAITCHI *et al.*, 2005).

A proteína ADAM33 apresenta-se localizada no citoplasma (~84%) preferencialmente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi sendo que menos de 10% dela está localizada na membrana plasmática, incluindo ambas as formas imatura e madura (GARLISI *et al.*, 2003; POWELL *et al.*, 2004).

No entanto, estudos recentes demonstraram a presença de uma forma solúvel da ADAM33 (sADAM33), de 55 kDa no meio extracelular em lavado

broncoalveolar (PUXEDDU *et al.*, 2008). Além disso, parece que essa sADAM33 tem a capacidade de promover a angiogênese (PUXEDDU *et al.*, 2008).

O gene *ADAM33* pode apresentar diversos polimorfismos e alguns destes tem sido fortemente relacionados à asma, doença crônica comum na infância e na vida adulta (EERDEWEGH *et al.*, 2002). Essas evidências têm sido confirmadas em diversos estudos (CAKEBREAD *et al.*, 2004; HOLGATE *et al.* 2005; HAITCHI *et al.*, 2005; DAVIES, 2009; YANG *et al.*, 2012).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *ADAM33* e asma em crianças e adultos podem modificar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da asma de forma mais severa (EERDEWEGH *et al.*, 2002; HOLGATE *et al.*, 2005; HAITCHI *et al.*, 2005; Davies, 2009). A asma é uma doença inflamatória associada com alterações na arquitetura normal das paredes das vias aéreas, tornando-as remodeladas. A mudança dessa estrutura é caracterizada por hiperplasia e metaplasia, desenvolvimento de células da musculatura lisa pulmonar, formação de novos vasos, e depósito de colágeno intersticial (DAVIES, 2009). As alterações relacionadas ao gene *ADAM33* na asma conduzem a perda da função pulmonar devido ao remodelamento tecidual (CAKEBREAD *et al.*, 2004; HOLGATE *et al.*, 2005; HAITCHI *et al.*, 2005; DAVIES, 2009).

Os mecanismos que envolvem esse remodelamento pulmonar e a proteína *ADAM33* são ainda incertos. Sabe-se que, a *ADAM33* é expressa nos fibroblastos pulmonares e músculo liso brônquico e a expressão nas células epiteliais é controversa. Dijkstra *et al.*, (2009) descrevem a expressão de *ADAM33* em células epiteliais brônquicas enquanto que Yang e colaboradores (2008) descobriram que o gene é silenciado nessas células por metilação do promotor do gene *ADAM33*.

Buscando identificar, ainda, o envolvimento da *ADAM33* e a asma, Yang *et al.*, (2012) mostraram que a regulação do gene *ADAM33* em fibroblastos pulmonares, envolve mecanismos epigenéticos com a modificação de histonas e condensação de cromatina, mas não metilação do DNA, sendo que estes mecanismos parecem ser controlados pelo TGF- β .

A *ADAM33*, como outras ADAMs, parece estar relacionada com adesão celular através da integrina $\alpha 9\beta 1$. Esta integrina é expressa em neutrófilos (mediando eventos de adesão que facilitam a migração trans-endotelial destas células), em epitélio das vias aéreas, na camada basal do epitélio escamoso, na musculatura lisa, na musculatura esquelética, em hepatócitos e monócitos (ETO *et*

al., 2002). ADAM33 também possui a habilidade de inibir a migração celular mediada pelas integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (HUANG *et al.*, 2005). Apesar da caracterização dessas interações ADAM33 - integrinas, são necessários mais estudos envolvendo a ADAM33 em eventos de adesão para esclarecer seu papel nesses processos.

A relação entre ADAM33 e o câncer gástrico foi discutida por Kim *et al.* (2009), que utilizaram silenciamento de ADAM33 por siRNA. A ausência de ADAM33 resultou na redução da proliferação e migração de células tumorais em cultivo.

Holloway *et al.* (2010) sugerem que ADAM33 está implicada na patogênese da aterosclerose. Essa doença envolve inúmeros eventos incluindo o acúmulo de LDL nas artérias, adesão de leucócitos no endotélio vascular, com subsequente, migração desses leucócitos através do endotélio, migração de células musculares lisas da camada média para íntima e aumento da produção de proteínas da matriz extracelular. Esses eventos em conjunto com moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e a matriz extracelular propiciam a formação da placa de aterosclerose.

Foi demonstrado que ADAM33 está envolvida no processo de inibição da migração de células da musculatura lisa e isso poderia promover o desenvolvimento de placas ateroscleróticas instáveis. Além disso, detectaram uma associação entre SNPs do gene *ADAM33* e a extensão da aterosclerose em pacientes com doença arterial coronariana (HOLLOWAY *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

O grupo de pesquisa (Grupo de estudos em Epigenômica / CNPq) estuda epigenética tendo como principal alvos novos marcadores moleculares em câncer de mama. Em 2004 Costa *et al.*, propuseram que a hipermetilação do promotor do gene *ADAM23* apresenta correlação com o desenvolvimento de metástases em câncer de mama. Outro membro da família ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain), o gene *ADAM33* apresentou sua expressão diminuída devido ao silenciamento por hipermetilação do promotor em carcinomas lobulares invasivos, CLIs, com $p < 0,0002$ (SENISKI *et al.*, 2009).

Pelas características da proteína ADAM33 e as evidências discutidas, parece que o produto deste gene pode auxiliar na falta de coesão entre as células nos carcinomas lobulares invasivos, nos quais o gene *ADAM33* é desligado epigeneticamente. Dessa forma, o gene *ADAM33* poderia ser utilizado como um novo marcador para a diferenciação entre os carcinomas lobulares e ductais, sendo que ocasionalmente as características destes dois tipos de tumores se sobrepõem principalmente nos casos de carcinomas mistos. Diante disso, existe uma necessidade de encontrar novos marcadores de utilidade clínica (imunohistoquímica, por exemplo) além da E-caderina, para ser empregado na diferenciação dos tipos de tumores (TURASHVILI *et al.*, 2005; TURASHVILI *et al.*, 2007).

A validação do gene *ADAM33* como biomarcador molecular de CLIs depende de sua utilização em imunohistoquímica. O anticorpo policlonal da marca Sigma que foi utilizado em trabalhos anteriores, não foi eficiente como marcador em tecido. Além disso, esse anticorpo tem o custo elevado para ser utilizado como marcador em imunohistoquímica. Por essa razão, em continuidade ao trabalho iniciado com o gene *ADAM33*, foi realizada a clonagem de uma parte desse gene, expresso um domínio da proteína ADAM33 recombinante e produzido anticorpos policlonais. Os anticorpos produzidos foram utilizados em amostras de tumores em parafina através da técnica de imunohistoquímica em *tissue array* e ficou caracterizado o potencial de utilização da proteína ADAM33 como biomarcador de CLIs. Será possível a partir destes resultados obter anticorpos monoclonais úteis como bioferramenta de diagnóstico e também para estudo funcional da proteína ADAM33 em tumores de mama e em outras patologias.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação foi validar a utilização da proteína ADAM33 como um biomarcador inédito de diagnóstico de carcinoma lobular invasor através de imunohistoquímica.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- Clonar uma parte do gene *ADAM33* em vetor de expressão de proteínas em sistema procarionte.
- Expressão e purificação de parte da proteína ADAM33 humana (domínio rico em cisteínas).
- Produção de anticorpos policlonais em camundongos Balb/c.
- Testar a especificidade dos anticorpos policlonais utilizando extrato de proteínas de linhagens tumorais de mama.
- Testar os anticorpos policlonais para avaliar o padrão de expressão da proteína ADAM33 em tumores de mama preservados em parafina e dispostos em lâminas de vidro (*Tissue micro array*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E LINHAGENS TUMORAIS

Estirpe Bacteriana	Genótipo relevante	Referência
BL21(DE3) pLysS	<i>hsdS gal (λclts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7. Cam ^R .	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
BL21 Star	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm rne131</i>	INVITROGEN
BL21 Ai	F- <i>ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm araB:T7RNAP-tetA</i> .	INVITROGEN
DH10B	Smr, F'[<i>proAB+lacZΔM15</i>]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
Plasmídeos recombinantes	Genótipo relevante	Referência
pGEMT [®] easy	Vetor de expressão, contém promotor T7 RNA polimerase, Amp ^R	PROMEGA
pET28a	Vetor de expressão, contém promotor T7, expressa a proteína com cauda de 6 Histidinas na região N-terminal , Km ^R .	NOVAGEN
pGM04	pGEMT [®] easy contendo inserto de 611 pb que codificam parte do domínio disintegrina e o domínio rico em cisteína.	Este trabalho
pGM05	pET28a contendo inserto de 631 pb que codificam parte do domínio disintegrina e o domínio rico em cisteína.	Este trabalho
Linhagens Tumorais	Genótipo relevante	Referência
PMC42	Não expressa a proteína ADAM33	LACROIX & LECLERCQ, 2004
MCF7	Não expressa a proteína ADAM33	LACROIX & LECLERCQ, 2004
MDA-MB-231	Expressa a proteína ADAM33	LACROIX & LECLERCQ, 2004

QUADRO 1- DESCRIÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS, VETORES E LINHAGENS TUMORAIS UTILIZADAS NO TRABALHO.

FONTE: O autor.

4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados para o cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram o Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), Luria Bertani Agar (LA) (SAMBROOK *et al.*, 1989), SOC e SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Composição do meio LB:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

Para a obtenção do meio LA, usado para cultivo em meio sólido, adicionou-se 15 g/L de ágar ao meio LB.

Composição do meio SOB:

	gramas/litro
Triptona	20
NaCl	0,6
KCl	0,186

O meio SOC foi obtido adicionando-se glucose 3,6 g/L, MgCl₂ 0,94 g/L e MgSO₄ 1,2 g/L ao meio SOB.

O meio de cultura utilizado para o cultivo de linhagens tumorais foi o RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10 a 20 % de soro fetal bovino (Gibco).

4.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram adicionados ao meio, de acordo com a resistência da estirpe ou do vetor. Os antibioticos utilizados foram: canamicina (Km) 100 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL e estreptomicina (Sm) 20 µg/mL para *E. coli*. Para as linhagens tumorais utilizamos garamicina (40 µg/mL). As soluções estoque dos

antibióticos foram preparadas como descrito por Sambrook *et al.* (1989) e mantidas a 8°C.

4.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE UMA PARTE DO GENE *ADAM33* EM VETOR DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

A proteína ADAM33 foi inicialmente comparada à todas as proteínas da família ADAM utilizando o programa Clustalw (www.ebi.ac.uk/clustalw/). A região de interesse para clonagem foi determinada como aquela que apresentava o maior número de aminoácidos diferentes entre as proteínas da família ADAM. A região selecionada foi amplificada e clonada inicialmente em vetor adequado para sequenciamento (pGEM®Teasy) e em seguida subclonada após a digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e ligada ao vetor pET28a (Novagen).

As reações de amplificação foram feitas com cDNA de células de mama normais (proveniente do Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer-SP), usando os seguintes iniciadores: Universal: 5' ACC TAC TGG ACG GCT CAC C e Reverso: 5' GCA GGA AGG TGT CAT GGT TT. Esses iniciadores (*primers*) foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). E conferidos através do alinhamento com o genoma humano usando o programa BlastN, disponível em (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blast&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BLASTSearch).

A reação de PCR foi realizada com 1 µL de cDNA em volume final de 20 µL contendo tampão 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmol de iniciadores específicos sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação por 5 minutos a 95 °C e em seguida 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos as moléculas tiveram um tempo de extensão extra de 5 minutos a 72°C. O produto de PCR foi purificado a partir de gel de agarose utilizando o kit Qiaex (Qiagen), em seguida ligado no vetor pGEM®Teasy (Promega) e transformado em *E. coli* DH10B por eletroporação (descrito a seguir).

A seleção de clones ocorreu por alfa complementação, sendo que, a presença do inserto foi confirmada por amplificação de DNA de colônias brancas utilizando os iniciadores específicos. Para isso a reação de PCR realizada em volume de 10 μ L contendo 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1U *Taq* e 8 pmol de iniciadores específicos e uma porção da colônia branca de interesse foi coletada com auxílio de um palito. As condições de amplificação foram desnaturação por 5 minutos a 95 °C e em seguida 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos as moléculas tiveram um tempo de extensão extra de 5 minutos a 72 °C. Os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida revelado com nitrato de prata, usando o marcador de massa molecular 100 bp (Fermentas).

As colônias contendo o inserto do tamanho adequado foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) e utilizadas para purificação do DNA plasmidial utilizando o Kit de purificação de plasmídeos (Qiagen).

Os clones obtidos foram confirmados através de sequenciamento de DNA. A reação de sequenciamento foi realizada com 300 a 500 nanogramas de DNA dos plasmídeos utilizando o protocolo BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) disponível para o sequenciamento automático no sequenciador ABI 3110 (Applied Biosystems-Perkin Elmer) segundo as especificações dos fornecedores. As reações foram feitas em um sistema de 10 μ L contendo: 3 μ L de BigDye Terminator v3.0, 1 μ L de Tampão Save Money 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM $MgCl_2$), 10 pmol de iniciadores universal ou reverso M13 (Invitrogen). As condições da reação de sequenciamento foram: desnaturação 95°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos e 30 segundos para anelamento e extensão.

Após a confirmação da clonagem e também de que nenhuma base foi alterada, o plasmídeo recombinante denominado pGM04 foi produzido em larga escala utilizando kit de midiprep (Qiagen). O DNA purificado foi digerido com enzima de restrição *EcoRI* (Gibco) que flanqueia o inserto no vetor utilizado (não existem sítios dessa enzima no fragmento de interesse). Em seguida, o produto obtido foi purificado utilizando o protocolo da Qiagen de extração de fragmento de DNA do gel de agarose. Posteriormente o fragmento foi subclonado no vetor de expressão de proteína pET28a (Novagen) digerido com a mesma enzima *EcoRI* gerando o plasmídeo pGM05 que foi também confirmado por sequenciamento.

4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Para o preparo de células eletrocompetentes, um pré-inóculo de 5 mL da célula foi crescido sob agitação durante a noite em meio LB com os antibióticos adequados. O inóculo foi preparado a partir de 2 mL de pré-inóculo em 200 mL de meio SOB, em frasco erlenmeyer de 1 L e crescido até atingir DO_{600} entre 0,4 e 0,7. A cultura foi mantida por 30 minutos no gelo e centrifugada a $3000 \times g$ durante 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em água destilada gelada estéril e uma vez em glicerol 15% gelado. Toda a manipulação foi feita no gelo.

Para a eletroporação, 1 a 2 μ L de DNA plasmidial (aproximadamente 100 ng) ou 1 μ L de ligação foram adicionados a 40 μ L de células eletrocompetentes e a mistura transferida cuidadosamente para as cubetas de eletroporação. As células foram submetidas a um rápido pulso elétrico de 10 Kv/cm (4 K Ω , 330 μ F) (Eletroporador BioRad), e em seguida foram ressuspensas em meio SOC sob agitação a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio LA seletivo contendo os antibióticos apropriados.

4.6 EXPRESSÃO DO DOMÍNIO RECOMBINANTE DA PROTEÍNA ADAM33

A expressão da proteína ADAM33 recombinante foi testada nas estirpes de *E. coli* BL21: pLysS, Star e Ai (Quadro 1). O objetivo do uso dessas estirpes foi a escolha da mais adequada para expressão da proteína de interesse. As bactérias foram transformadas e selecionadas com antibióticos apropriados para cada estirpe, e a presença do plasmídeo após eletroporação confirmada através PCR de colônia.

Para indução da expressão das proteínas recombinantes utilizamos o protocolo que consiste em inocular 3 colônias da bactéria de escolha em 3 mL de meio LB a 37°C e sob agitação a 200 rpm por toda noite. Após aproximadamente 18 horas de crescimento uma alíquota de 100 μ L de pré-inóculo foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo antibióticos. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação constante até DO_{600} próxima de 0,6. Nesse ponto a expressão foi induzida com 1,0

mMol/L de IPTG para as estirpes pLysS e Star. A estirpe BL21 Ai foi induzida com 1,0 mMol/L de IPTG e 2% de arabinose. As induções foram feitas por 4 horas a 200 rpm e 37°C. Como controle negativo, para as diferentes estirpes, foi reproduzido o experimento, porém sem adição do agente indutor. Após o período de indução as bactérias foram aliquoteadas (1,5 mL) em tubos tipo eppendorf, centrifugadas por 5 min 3000 x g e o precipitado submetido à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) como descrito a seguir.

4.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES

As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% e do gel de empilhamento foi de 4%. As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e fervidas durante 5 minutos antes da aplicação. A voltagem da corrida variou de 180 a 200V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Bio-Safe™ Coomassie (Bio-Rad) ou transferidas para membrana (western blot) dependendo do ensaio.

4.8 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Estabelecido o método e a estirpe bacteriana mais adequada para expressão da proteína recombinante, foi feito o ensaio de solubilidade da proteína. A indução da expressão foi repetida em 10 mL de cultura e após o período de indução a cultura foi dividida em 4 alíquotas, que foram centrifugadas em 3000 x g por 5 minutos à 4 °C. As células foram ressuspensas em diferentes tampões:

- Baixa concentração de sal: NaCl 50 mM, Tris 50 mM,

- Alta concentração de sal: NaCl 500 mM, Tris 50 mM,
- Alta concentração de uréia: Uréia 8M, NaCl 50 mM, Tris 50 mM
- Alta concentração de guanidina: guanidina 8 M, NaCl 50 mM, Tris 50 mM

A seguir as células foram lisadas por sonicação em um sonicador Heat System equipado com micropona, em banho de gelo, por 6 ciclos de 10 segundos, intercalados com 20 segundos de intervalo. Após a lise total, o extrato foi centrifugado e separado o sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (insolúvel). Todas as frações tiveram concentração da proteína determinada (como descrito a seguir) e, foram submetidos à eletroforese desnaturante.

4.9 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA A PURIFICAÇÃO

Após determinação da estirpe de *E. coli*, condições de indução e tampão adequados para expressão da proteína, a estirpe BL21 Ai contendo o plasmídeo pGM05 foi cultivada em 10 mL de LB durante a noite. A cultura foi utilizada para inocular 100 mL de LB a 37°C sob agitação de 200 rpm até DO₆₀₀ próxima de 0,6. Neste ponto foi adicionado 1mmol/L de IPTG e 2% de arabinose, seguido de incubação sob agitação a 37°C por 4 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 5 minutos. O meio sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em 30 mL de tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8; NaCl 50mM, 20 mM imidazol, 8 M uréia e glicerol 10%. As células foram então lisadas por sonicação em um sonicador Heat System equipado com micropona, em banho de gelo, por 6 ciclos de 20 segundos, intercalados com 30 segundos de intervalo. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C, para separação das frações solúvel e insolúvel.

4.10 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ADAM33 RECOMBINANTE

A proteína ADAM33 fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal foi purificada utilizando coluna HiTrap Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare) como descrito pelo fabricante, acoplada ao cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare). A coluna de 1 mL acoplada foi equilibrada com 5 mL do tampão de sonicação para ADAM33 (TP1: 50 mM Tris-HCl pH8; NaCl 50mM, 20mM imidazol, 8M uréia e glicerol 10%) em seguida, 30 mL do extrato livre de células, preparado como descrito anteriormente, foram aplicados na coluna. A solução de proteínas foi injetada, num fluxo de 1mL/min na coluna, em seguida, essa foi lavada com 10 mL de TP1. A proteína ADAM33 foi eluída utilizando um gradiente contínuo de 20 mM a 1 M de imidazol equivalente a 20 mL. As amostras foram coletadas em alíquotas de 1 mL. Amostras de 10 µL das frações obtidas e correspondentes ao pico de eluição no cromatograma foram coletadas para análise em gel SDS-PAGE. As frações que apresentaram maior pureza foram reunidas e dialisadas em 1 L de solução de diálise contendo: 50 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-HCl e 10% glicerol pH 8,0. A diálise foi realizada a temperatura de 4°C por 48 horas.

Após a diálise, procedeu-se a quantificação da concentração protéica das amostras utilizando o método de Bradford (1976) como descrito a seguir.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As concentrações das proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As reações foram preparadas em microplacas de 96 poços, o sistema de reação continha 170 µL da solução corante (Reagente de Bradford – Sigma) e 1 µL da amostra. A curva padrão utilizou albumina de soro bovino (BSA) como padrão em concentração de 0,6 a 6 µg/µL, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas em 595 nm. O limite de sensibilidade do método é de 1 a 10 µg de proteína.

4.12 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS OU WESTERN BLOT

As amostras a serem analisadas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12% utilizando o método descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um sistema de transferência semi-seco (Pharmacia). A transferência utilizou a placa do ânodo coberta com 4 camadas de papel filtro contendo o tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) seguido da membrana de PVDF (Hybond ECL- GE Healthcare ativada com metanol). O gel, então foi colocado sobre a membrana evitando-se bolhas de ar no sistema. Outras quatro camadas de papel filtro previamente imersas em tampão de transferência foram colocadas sobre o gel. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 100 mA, em 25 V por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (Thermo Scientific) na membrana.

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST três vezes e incubada com 10 mL de solução de leite 5% TBST com o anticorpo primário 1:10.000, sendo mantida sob agitação durante 18 horas a temperatura ambiente. O anticorpo primário foi retirado através de três lavagens sucessivas com TBST. O anticorpo secundário foi o Anti-mouse IgG HRP (Sigma) de concentração 1 mg/mL diluído 1:10.000 vezes. Depois de cinco lavagens com TBST a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com Kit ECL Plus Western Blotting Detection GE contendo peroxidase utilizando filme de RaioX seguido de revelação com tampões revelador e fixador.

Nos experimentos de western blot para identificação inicial da proteína recombinante ADAM33, foram usados 5 µg de proteína após a purificação. O anticorpo primário usado nessa etapa foi o anti-histidina (Amersham) na diluição 1:10.000.

A especificidade do anticorpo-policlonal, também, foi testada por western blot utilizando linhagens tumorais e será descrito a seguir.

4.13 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

Foram utilizados quatro camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c, mantidos no biotério setorial do Centro de Ciências Biológicas da UFPR, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento. A produção de anticorpos foi realizada como descrita por Harlow & Lane (1988).

Os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com o certificado numero 435 (processo 23075.010136/2010-20).

Antes das imunizações os animais foram sangrados pela via do plexo retroorbital para retirada de soro pré-imune (aproximadamente 200µl de sangue total/animal), que foi mantido por 1 h em temperatura ambiente até sua coagulação e então centrifugado 900 x g por 5 minutos para separação do soro. O soro foi armazenado a -20°C até sua utilização. Após 14 dias da terceira imunização os animais foram sangrados novamente para obtenção do soro policlonal.

Para obtenção dos anticorpos policlonais os animais foram imunizados. Uma dose de 50 ng da proteína purificada foi utilizada por camundongo, para cada uma das 3 imunizações que foram feitas por via subcutânea. A primeira imunização foi suplementada com Adjuvante Completo de Freund, a segunda e a terceira imunização com Adjuvante Incompleto de Freund. O intervalo entre as imunizações foi de 14 dias.

4.13.1 Titulação dos Anticorpos policlonais

Microplacas descartáveis de poliestireno de 96 cavidades (Falcon) foram utilizadas, e todos os imunoreagentes ensaiados no volume de 100 µl. Entre todos os passos da reação, as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20. Para a sensibilização das placas foram utilizados 10 ng da proteína purificada por poço, diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 9,6), sendo a incubação de 14 h a 4°C. A seguir, foi feito o bloqueio contra reações inespecíficas,

sendo adicionados, por poço, 120 µl de solução PBS-Tween 0,05% acrescida de 2% caseína. O bloqueio ocorreu por 1 h a 37°C. Como anticorpo primário, foram utilizados os soros obtidos dos camundongos imunizados, sendo os mesmos diluídos seriadamente, iniciando-se com uma diluição de 1:800. A seguir, foi acrescido o anticorpo secundário conjugado (Anti-IgG murino conjugado a peroxidase - Sigma®) a uma diluição de 5000 vezes. Ambos foram diluídos no mesmo tampão utilizado para o bloqueio das placas, sendo a incubação de 1 h a 37°C. Como controles da reação foram utilizados, no lugar do soro dos camundongos imunizados, soro de camundongos pré-ímmes, como controle negativo, e anticorpo anti-histidina produzido em camundongos, como controle positivo.

A revelação ocorreu com a adição de 100 µL de solução substrato-cromógeno orto-fenileno-diamina (OPD) (0,4% em solução tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,0, H₂O₂ 0,03%) por poço. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de H₂SO₄ a 2,5 N. Por fim, procedeu-se a leitura da densidade óptica a 492 nm em leitor de microplacas.

4.14 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI ADAM33

Com a intenção de testar a especificidade e a qualidade do anticorpo policlonal, ou seja, se esse seria capaz de sinalizar apenas a proteína ADAM33, testamos em western blot de linhagens tumorais de mama e imunohistoquímica de tumores de mama.

4.14.1 Western Blot de linhagens tumorais de mama

Para testar a especificidade do anticorpo-policlonal, realizamos o western blot do extrato total de proteínas de linhagens tumorais de mama. Para isso aproximadamente 100 µg de proteínas totais de cada linhagem foram submetidas à

eletroforese SDS-PAGE. As linhagens escolhidas para o experimento foram: controle positivo MCF7 e PMC42 que expressam a proteína ADAM33 e a linhagem MDA-MB-231 que não expressa ADAM33 como controle negativo (SENISKI *et al.*, 2009). Utilizando como anticorpo primário o anticorpo policlonal (soro dos camundongos) na diluição 1:10.000.

Para obtenção dos extratos das linhagens, essas foram crescidas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino até $\pm 10^6$ células/mL. As placas de cultivo foram lavadas com PBS 1X gelado, em seguida, foi adicionado 100 μ L PBS 1X gelado contendo 1 μ L de inibidor de protease (Kit Halt™ Thermo Scientific) e 1 μ L de EDTA 0,5 M. Em seguida as células foram raspadas das placas com auxílio de *scrape* e transferidas para tubo tipo eppendorf. As células foram centrifugadas a 900 x g 10min a 4°C, o meio foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 μ L de tampão de lise (SDS 1%, Tris 50 mM), contendo 3 μ L de inibidor de protease (Kit Halt™ Thermo Scientific) e 3 μ L de EDTA 0,5 M. Em seguida as células foram sonicadas em 6 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 30 segundos e sempre em banho de gelo.

Esses extratos foram submetidos à eletroforese desnaturante e western blot como já descrito anteriormente.

4.14.2 Tissue Micro Array – TMA

O teste dos anticorpos policlonais foi feito através da identificação de tumores de mama em ensaio de imunohistoquímica. Os materiais tumorais empregados provem de estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, que utilizou amostras de câncer de mama do tipo ductal e lobular. Silva (2011) em sua dissertação de mestrado preparou blocos de parafina contendo 16 amostras tumorais de mama (ductal e lobular) que foram dispostos utilizando-se a técnica de TMA seguindo protocolo desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental - PUCPR (SCHULER, GURMINI *et al.*, 2008). Para cada bloco foram realizadas várias secções de 4 μ M utilizando de um micrótomo RM2145 (Leica®) e foram transferidas

para lâminas adesivas catiônicamente carregadas para contenção do material biológico.

4.14.3 Imunohistoquímica

Foram realizadas reações de imunohistoquímica nas secções dos tumores provenientes do bloco de TMA. As lâminas contendo os tumores foram desparafinizadas através de 2 lavagens em xilol por 10 minutos, 3 lavagens com etanol absoluto por 1 minuto e 1 vez com álcool etílico 80% por 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o Kit Advance (Dako®), que apresenta solução de peróxido de hidrogênio 5% em metanol. Após retirado o excesso dos reagentes, foi realizada a recuperação antigênica no Imuno Retrifer (Dako®) em banho maria à 99°C por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso dos reagentes. O anticorpo primário usado 1:250, foi o soro dos camundongos imunizados com o domínio recombinante da ADAM33, as lâminas foram incubadas em câmara úmida na geladeira por toda a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e depois incubadas por 15 minutos com tampão TBS tris pH 7,3. A seguir foi adicionado o anticorpo secundário: Advance link (Dako®) por 30 minutos. Seguido do reagente Advance enzyme (Dako®), por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Foram realizadas as lavagens em água por 5 minutos, 3 vezes com etanol absoluto por 1 minuto e a diafanização com 3 lavagens com xilol por 5 minutos. Por último, foi adicionada a lamínula para proteção dos cortes.

A visualização das amostras foi realizada em microscópio óptico BX50 (Olympus®) acoplado com uma câmera (DinoLyfe®). O software utilizado para obtenção digital das imagens foi o Image pro Plus 4.5. Cada corte foi escaneado com objetiva de 400x de aumento. Contando com o auxílio da patologista Dra. Lúcia de Noronha do Laboratório de Patologia Experimental - PUCPR, onde foi realizada a avaliação da intensidade da imunoreatividade.

As amostras foram classificadas quanto à expressão da proteína ADAM33. Os carcinomas tiveram os escores baseados no número de células positivas para a

proteína ADAM33 visualizadas na imunohistoquímica. O valor do *cutt-of* para a ADAM33 foi em torno de 10% de células positivas. As lâminas foram classificadas segundo os critérios de membrana e citoplasma: <10% de células tumorais com reação positiva classificada como 0. Células tumorais entre 10-30% de reação positiva classificada como 1. As células tumorais entre 30-50% de reação positiva classificados como 2 e >50% de células tumorais com reação positiva, membrana ou citoplasmática, pontuada como 3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DA REGIÃO DA PROTEÍNA ADAM33 PARA CLONAGEM

A região de interesse para clonagem foi escolhida pelo número de aminoácidos diferentes das demais proteínas da família ADAM e também pela análise do programa Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). O programa selecionou a região mais apropriada de anelamento dos iniciadores para posterior produção do fragmento para clonagem. Foi feita, também, uma análise da sequência da proteína ADAM33 comparando-a com todas as proteínas da família ADAM. Esta análise é de extrema importância uma vez que nosso objetivo intuito é a produção de anticorpos monoclonais e quanto mais específica a sequência da proteína produzida melhor será a especificidade dos anticorpos produzidos.

As sequências de todas as proteínas ADAMs foram avaliadas quanto a similaridade através do programa de análise de similaridade ClustalW, disponível através do software (www.ebi.ac.uk/clustalw/). A partir desta etapa foi possível caracterizar as proteínas pertencentes a esta família quanto a sua sequência e delimitar as regiões que diferem entre si. Este programa fornece uma análise de similaridade entre as sequências analisadas, fornecendo um cladograma que pode ser visualizado na Figura 3.

Phylogram

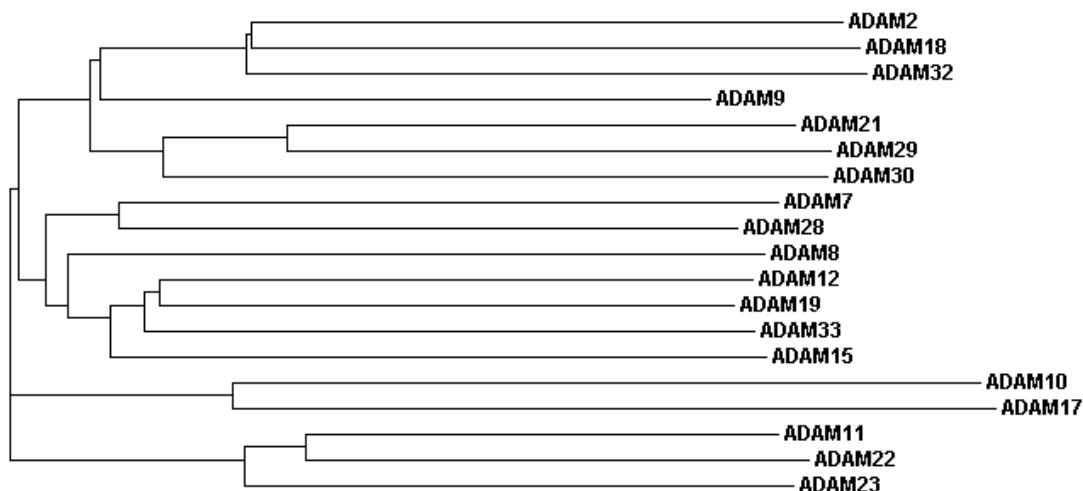


FIGURA 3 - CLADOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE DO PROGRAMA CLUSTALW DE SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM. As sequências de todas as proteínas foram analisadas em conjunto neste programa e quanto mais semelhantes elas forem entre si, mais próximas estarão.

FONTE: CLUSTALW.

Através deste cladograma, podemos perceber que as proteínas ADAM33, ADAM19 e ADAM12 estão próximas e portanto são as que mais se assemelham quanto a sua sequência. Entretanto a proteína ADAM19 não é expressa em tecido mamário normal ou tumoral, sendo expressa no endométrio (EDWARDS *et al.*, 2008). A partir desses resultados, avaliamos especificamente as duas proteínas mais próximas filogeneticamente que são a ADAM33 e ADAM12, as quais são expressas na mama (SENISKI *et al.*, 2009; IBE *et al.*, 1999). Esta análise de comparação de sequência de aminoácidos foi feita novamente através do programa ClustalW, (Figura 4). Nesta figura está destacada o aminoácido inicial e final da região que foi escolhida para clonagem pelo programa Primer3.

ADAM33	MGWRPRRAR-GTPLLLLLLLLLLLWPVGAGV-LQGHIPGQPVTTPHWLDGQPWRTVSLEE	58
ADAM12	MAARPLPVSPARALLLALAGALLAPCEARGVSLWNQGRADEVVSVSGDGLWIPVKSFD	60
	*. ** . . .*** * ** * . ** * .: .: *.. * .*: * .*: .:	
ADAM33	PVSKPDMGLVALEAEGQELLLEKHNHRLAPGYIETHYGPDPGQPVVLAPNHT---DHCH	115
ADAM12	SKNHPEVLNIRLQRESKELIINLERNEGLIASSFTETHYLQDGTVDVSLARNYTVILGHCV	120
	. .:***: : *: *.:***:***. *:..: **** ** * ** *: * .**:	
ADAM33	YQGRVVRGFPDSWVVLCTCSGMSGLITLSRNASYLLRPWPPRGSKDFSTHEIFRMEQLLTW	175
ADAM12	YHGHVRGYSDSAVSLSTCSGLRGLIVFE-NESYVLEPMKSATNR----YKLFPAKKLKS	175
	:.***:.* * *.***: ***. . * ** *. * . .: :*: :*: :	

clonagem. Além disso, como os animais a serem inoculados seriam camundongos, analisamos também a semelhança entre as proteínas ADAM33 de camundongo e humano quanto a região escolhida para clonagem (figura 5).

```

HUMANADAM33V1 -----LRPGAQCAHGDCCVRCILKPAGALCRQAM 29
MOUSEADAM33V1 CGNGFLEAGEECDGSGQKCPDPCCFAHNCSLRAGAQCAHGDCCARCLLKSAGTPCRPAA 480
                **.*.....*.*****.**: ** *

HUMANADAM33V1 GDCDLPEFCTGTSSHCPPDVYLLDGSPCARGSGYCWGACPTLEQQCQQLWPGSGHPAPE 89
MOUSEADAM33V1 TDCDLPEFCTGTSPYCPADVYLLDGSPCAEGRGYCLDGWCPTLEQQCQQLWPGSGKPAPE 540
                *****.:**.*.....*. * ** * *****.:*****

HUMANADAM33V1 ACFQVNSAGDAHGNCQDSEGHFLPCAGRDALCGKLCQCGGKPSLLAPHMVPVDSTVHL 149
MOUSEADAM33V1 PCFQQMNSMGNSQGNCGQDHKGSFLPCAQRDALCGKLLCQGGEPNPLVPHIVTMDSTILL 600
                .*** :** *::***** :* ***** ***** *****:*. *.**.*.:***: *

HUMANADAM33V1 DGQEVTCRGALALPSAQLDLLGLGLVEPGTQCGPRMVCQSRRRCRKNFQELQRCLTACHS 209
MOUSEADAM33V1 EGREVVCRGAFVLPDSHLDQLDLGLVEPGTGCGPRMVCQDRHCQNATSQELERCLTACHN 660
                :*:**.*.....*:**.:** *.*.....* *****.**:*: : ***:*****.

HUMANADAM33V1 HGVCNSNHCHCAPGWAPPFCDKPGFGGSMDSGPVQAENHDTFL----- 253
MOUSEADAM33V1 GGVCNSNRNCHCAAGWAPPFCDKPGLGGVDSGPAQSANRDAFPLAMLLSFLPLLPAG 720
                *****:*****.*****.***:*****.*: *::*

```

FIGURA 5 - ANÁLISE DE SEMELHANÇA PELO CLUSTALW DAS PROTEÍNAS ADAM33 HUMANA E ADAM33 DE CAMUNDONGO VARIANTE 1. A proteína ADAM33 humana está somente com o fragmento de interesse no trabalho. Na sequência está representado como “*” os aminoácidos idênticos nas duas sequências. “.” os aminoácidos do mesmo grupo (conservada substituição). “:” (pontos) os aminoácidos pertencentes ao mesmo grupo (semi conservada substituição). Regiões onde não há - não condiz a similaridade entre os aminoácidos nas duas sequências. **OBS:73,12% DE IDENTIDADE.**

FONTE: CLUSTALW.

Observamos que a identidade entre as proteínas ADAM33 de camundongo e humana é de 73%. Não havia como prever qual seria a reação do animal diante da produção do anticorpo contra a proteína ortóloga. Em nossa experiência com os domínios metaloprotease e disintegrina da proteína ADAM23 encontramos uma similaridade de 87% com a proteína ortóloga de camundongo e apesar disso foram obtidos anticorpos policlonais com qualidade e bom título (KLASSEN, 2005).

A seguir está mostrada a sequência de nucleotídeos do gene ADAM33 e dos aminoácidos da proteína ADAM33, com destaque na região de anelamento dos iniciadores. Observar que o primer universal planejado não tem o primeiro nucleotídeo do códon do primeiro aminoácido (Tyr). Este cuidado foi planejado sabendo que após a clonagem no pGEMT®easy será inserido um nucleotídeo timina (T) nas pontas do fragmento clonado.

1	GCT	GCA	CCG	GGC	ACG	GGT	CGG	CCG	CAA	TCC	AGC	CTG	GGC	GGA	GCC	45
1	Ala	Ala	Pro	Gly	Thr	Gly	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	15
46	GGA	GTT	GCG	AGC	CGC	TGC	CTA	GAG	GCC	GAG	GAG	CTC	ACA	GCT	ATG	90
16	Gly	Val	Ala	Ser	Arg	Cys	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Thr	Ala	Met	30
91	GGC	TGG	AGG	CCC	CGG	AGA	GCT	CGG	GGG	ACC	CCG	TTG	CTG	CTG	CTG	135
31	Gly	Trp	Arg	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Gly	Thr	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	45
136	CTA	CTA	CTG	CTG	CTG	CTC	TGG	CCA	GTG	CCA	GGC	GCC	GGG	GTG	CTT	180
46	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Pro	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Leu	60
181	CAA	GGA	CAT	ATC	CCT	GGG	CAG	CCA	GTC	ACC	CCG	CAC	TGG	GTC	CTG	225
61	Gln	Gly	His	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Val	Thr	Pro	His	Trp	Val	Leu	75
226	GAT	GGA	CAA	CCC	TGG	CGC	ACC	GTC	AGC	CTG	GAG	GAG	CCG	GTC	TCG	270
76	Asp	Gly	Gln	Pro	Trp	Arg	Thr	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Val	Ser	90
271	AAG	CCA	GAC	ATG	GGG	CTG	GTG	GCC	CTG	GAG	GCT	GAA	GGC	CAG	GAG	315
91	Lys	Pro	Asp	Met	Gly	Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Gly	Gln	Glu	105
316	CTC	CTG	CTT	GAG	CTG	GAG	AAG	AAC	CAC	AGG	CTG	CTG	GCC	CCA	GGA	360
106	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Asn	His	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Gly	120
361	TAC	ATA	GAA	ACC	CAC	TAC	GGC	CCA	GAT	GGG	CAG	CCA	GTG	GTG	CTG	405
121	Tyr	Ile	Glu	Thr	His	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Val	Val	Leu	135
406	GCC	CCC	AAC	CAC	ACG	GAT	CAT	TGC	CAC	TAC	CAA	GGG	CGA	GTA	AGG	450
136	Ala	Pro	Asn	His	Thr	Asp	His	Cys	His	Tyr	Gln	Gly	Arg	Val	Arg	150
451	GGC	TTC	CCC	GAC	TCC	TGG	GTA	GTC	CTC	TGC	ACC	TGC	TCT	GGG	ATG	495
151	Gly	Phe	Pro	Asp	Ser	Trp	Val	Val	Leu	Cys	Thr	Cys	Ser	Gly	Met	165
496	AGT	GGC	CTG	ATC	ACC	CTC	AGC	AGG	AAT	GCC	AGC	TAT	TAT	CTG	CGT	540
166	Ser	Gly	Leu	Ile	Thr	Leu	Ser	Arg	Asn	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Arg	180
541	CCC	TGG	CCA	CCC	CGG	GGC	TCC	AAG	GAC	TTC	TCA	ACC	CAC	GAG	ATC	585
181	Pro	Trp	Pro	Pro	Arg	Gly	Ser	Lys	Asp	Phe	Ser	Thr	His	Glu	Ile	195
586	TTT	CGG	ATG	GAG	CAG	CTG	CTC	ACC	TGG	AAA	GGA	ACC	TGT	GGC	CAC	630
196	Phe	Arg	Met	Glu	Gln	Leu	Leu	Thr	Trp	Lys	Gly	Thr	Cys	Gly	His	210
631	AGG	GAT	CCT	GGG	AAC	AAA	GCG	GGC	ATG	ACC	AGC	CTT	CCT	GGT	GGT	675
211	Arg	Asp	Pro	Gly	Asn	Lys	Ala	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Pro	Gly	Gly	225
676	CCC	CAG	AGC	AGG	GGC	AGG	CGA	GAA	GCG	CGC	AGG	ACC	CGG	AAG	TAC	720
226	Pro	Gln	Ser	Arg	Gly	Arg	Arg	Glu	Ala	Arg	Arg	Thr	Arg	Lys	Tyr	240
721	CTG	GAA	CTG	TAC	ATT	GTG	GCA	GAC	CAC	ACC	CTG	TTC	TTG	ACT	CGG	765
241	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ile	Val	Ala	Asp	His	Thr	Leu	Phe	Leu	Thr	Arg	255
766	CAC	CGA	AAC	TTG	AAC	CAC	ACC	AAA	CAG	CGT	CTC	CTG	GAA	GTC	GCC	810
256	His	Arg	Asn	Leu	Asn	His	Thr	Lys	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Val	Ala	270
811	AAC	TAC	GTG	GAC	CAG	CTT	CTC	AGG	ACT	CTG	GAC	ATT	CAG	GTG	GCG	855
271	Asn	Tyr	Val	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Ile	Gln	Val	Ala	285
856	CTG	ACC	GGC	CTG	GAG	GTG	TGG	ACC	GAG	CGG	GAC	CGC	AGC	CGC	GTC	900
286	Leu	Thr	Gly	Leu	Glu	Val	Trp	Thr	Glu	Arg	Asp	Arg	Ser	Arg	Val	300
901	ACG	CAG	GAC	GCC	AAC	GCC	ACG	CTC	TGG	GCC	TTC	CTG	CAG	TGG	CGC	945
301	Thr	Gln	Asp	Ala	Asn	Ala	Thr	Leu	Trp	Ala	Phe	Leu	Gln	Trp	Arg	315
946	CGG	GGG	CTG	TGG	GCG	CAG	CGG	CCC	CAC	GAC	TCC	GCG	CAG	CTG	CTC	990
316	Arg	Gly	Leu	Trp	Ala	Gln	Arg	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Gln	Leu	Leu	330
991	ACG	GGC	CGC	GCC	TTC	CAG	GGC	GCC	ACA	GTG	GGC	CTG	GCG	CCC	GTC	1035
331	Thr	Gly	Arg	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Pro	Val	345

1036	GAG	GGC	ATG	TGC	CGC	GCC	GAG	AGC	TCG	GGA	GGC	GTG	AGC	ACG	GAC	1080
346	Glu	Gly	Met	Cys	Arg	Ala	Glu	Ser	Ser	Gly	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	360
1081	CAC	TCG	GAG	CTC	CCC	ATC	GGC	GCC	GCA	GCC	ACC	ATG	GCC	CAT	GAG	1125
361	His	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Met	Ala	His	Glu	375
1126	ATC	GGC	CAC	AGC	CTC	GGC	CTC	AGC	CAC	GAC	CCC	GAC	GGC	TGC	TGC	1170
376	Ile	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	His	Asp	Pro	Asp	Gly	Cys	Cys	390
1171	GTG	GAG	GCT	GCG	GCC	GAG	TCC	GGA	GGC	TGC	GTC	ATG	GCT	GCG	GCC	1215
391	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Gly	Cys	Val	Met	Ala	Ala	Ala	405
1216	ACC	GGG	CAC	CCG	TTT	CCG	CGC	GTG	TTC	AGC	GCC	TGC	AGC	CGC	CGC	1260
406	Thr	Gly	His	Pro	Phe	Pro	Arg	Val	Phe	Ser	Ala	Cys	Ser	Arg	Arg	420
1261	CAG	CTG	CGC	GCC	TTC	TTC	CGC	AAG	GGG	GGC	GGC	GCT	TGC	CTC	TCC	1305
421	Gln	Leu	Arg	Ala	Phe	Phe	Arg	Lys	Gly	Gly	Gly	Ala	Cys	Leu	Ser	435
1306	AAT	GCC	CCG	GAC	CCC	GGA	CTC	CCG	GTG	CCG	CCG	GCG	CTC	TGC	GGG	1350
436	Asn	Ala	Pro	Asp	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Leu	Cys	Gly	450
1351	AAC	GGC	TTC	GTG	GAA	GCG	GGC	GAG	GAG	TGT	GAC	TGC	GGC	CCT	GGC	1395
451	Asn	Gly	Phe	Val	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	Cys	Asp	Cys	Gly	Pro	Gly	465
1396	CAG	GAG	TGC	CGC	GAC	CTC	TGC	TGC	TTT	GCT	CAC	AAC	TGC	TCG	CTG	1440
466	Gln	Glu	Cys	Arg	Asp	Leu	Cys	Cys	Phe	Ala	His	Asn	Cys	Ser	Leu	480
1441	CGC	CCG	GGG	GCC	CAG	TGC	GCC	CAC	GGG	GAC	TGC	TGC	GTG	CGC	TGC	1485
481	Arg	Pro	Gly	Ala	Gln	Cys	Ala	His	Gly	Asp	Cys	Cys	Val	Arg	Cys	495
1486	CTG	CTG	AAG	CCG	GCT	GGA	GCG	CTG	TGC	CGC	CAG	GCC	ATG	GGT	GAC	1530
496	Leu	Leu	Lys	Pro	Ala	Gly	Ala	Leu	Cys	Arg	Gln	Ala	Met	Gly	Asp	510
1531	TGT	GAC	CTC	CCT	GAG	TTT	TGC	ACG	GGC	ACC	TCC	TCC	CAC	TGT	CCC	1575
511	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Phe	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	His	Cys	Pro	525
1576	CCA	GAC	GTT	TAC	CTA	CTG	GAC	GGC	TCA	CCC	TGT	GCC	AGG	GGC	AGT	1620
526	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	540
1621	GGC	TAC	TGC	TGG	GAT	GGC	GCA	TGT	CCC	ACG	CTG	GAG	CAG	CAG	TGC	1665
541	Gly	Tyr	Cys	Trp	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Thr	Leu	Glu	Gln	Gln	Cys	555
1666	CAG	CAG	CTC	TGG	GGG	CCT	GGC	TCC	CAC	CCA	GCT	CCC	GAG	GCC	TGT	1710
556	Gln	Gln	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Ser	His	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Cys	570
1711	TTC	CAG	GTG	GTG	AAC	TCT	GCG	GGA	GAT	GCT	CAT	GGA	AAC	TGC	GGC	1755
571	Phe	Gln	Val	Val	Asn	Ser	Ala	Gly	Asp	Ala	His	Gly	Asn	Cys	Gly	585
1756	CAG	GAC	AGC	GAG	GGC	CAC	TTC	CTG	CCC	TGT	GCA	GGG	AGG	GAT	GCC	1800
586	Gln	Asp	Ser	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Pro	Cys	Ala	Gly	Arg	Asp	Ala	600
1801	CTG	TGT	GGG	AAG	CTG	CAG	TGC	CAG	GGT	GGA	AAG	CCC	AGC	CTG	CTC	1845
601	Leu	Cys	Gly	Lys	Leu	Gln	Cys	Gln	Gly	Gly	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	615
1846	GCA	CCG	CAC	ATG	GTG	CCA	GTG	GAC	TCT	ACC	GTT	CAC	CTA	GAT	GGC	1890
616	Ala	Pro	His	Met	Val	Pro	Val	Asp	Ser	Thr	Val	His	Leu	Asp	Gly	630
1891	CAG	GAA	GTG	ACT	TGT	CGG	GGA	GCC	TTG	GCA	CTC	CCC	AGT	GCC	CAG	1935
631	Gln	Glu	Val	Thr	Cys	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Pro	Ser	Ala	Gln	645
1936	CTG	GAC	CTG	CTT	GGC	CTG	GGC	CTG	GTA	GAG	CCA	GGC	ACC	CAG	TGT	1980
646	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Thr	Gln	Cys	660
1981	GGA	CCT	AGA	ATG	GTG	TGC	CAG	AGC	AGG	CGC	TGC	AGG	AAG	AAT	GCC	2025
661	Gly	Pro	Arg	Met	Val	Cys	Gln	Ser	Arg	Arg	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	675

```

2026   TTC CAG GAG CTT CAG CGC TGC CTG ACT GCC TGC CAC AGC CAC GGG   2070
676   Phe Gln Glu Leu Gln Arg Cys Leu Thr Ala Cys His Ser His Gly   690

2071   GTT TGC AAT AGC AAC CAT AAC TGC CAC TGT GCT CCA GGC TGG GCT   2115
691   Val Cys Asn Ser Asn His Asn Cys His Cys Ala Pro Gly Trp Ala   705

2116   CCA CCC TTC TGT GAC AAG CCA GGC TTT GGT GGC AGC ATG GAC AGT   2160
706   Pro Pro Phe Cys Asp Lys Pro Gly Phe Gly Gly Ser Met Asp Ser   720

2161   GGC CCT GTG CAG GCT GAA AAC CAT GAC ACC TTC CTG CTG GCC ATG   2205
721   Gly Pro Val Gln Ala Glu Asn His Asp Thr Phe Leu Leu Ala Met   735

2206   CTC CTC AGC GTC CTG CTG CCT CTG CTC CCA GGG GCC GGC CTG GCC   2250
736   Leu Leu Ser Val Leu Leu Pro Leu Leu Pro Gly Ala Gly Leu Ala   750

2251   TGG TGT TGC TAC CGA CTC CCA GGA GCC CAT CTG CAG CGA TGC AGC   2295
751   Trp Cys Cys Tyr Arg Leu Pro Gly Ala His Leu Gln Arg Cys Ser   765

2296   TGG GGC TGC AGA AGG GAC CCT GCG TGC AGT GGC CCC AAA GAT GGC   2340
766   Trp Gly Cys Arg Arg Asp Pro Ala Cys Ser Gly Pro Lys Asp Gly   780

2341   CCA CAC AGG GAC CAC CCC CTG GGC GGC GTT CAC CCC ATG GAG TTG   2385
781   Pro His Arg Asp His Pro Leu Gly Gly Val His Pro Met Glu Leu   795

2386   GGC CCC ACA GCC ACT GGA CAG CCC TGG CCC CTG GAC CCT GAG AAC   2430
796   Gly Pro Thr Ala Thr Gly Gln Pro Trp Pro Leu Asp Pro Glu Asn   810

2431   TCT CAT GAG CCC AGC AGC CAC CCT GAG AAG CCT CTG CCA GCA GTC   2475
811   Ser His Glu Pro Ser Ser His Pro Glu Lys Pro Leu Pro Ala Val   825

2476   TCG CCT GAC CCC CAA GCA GAT CAA GTC CAG ATG CCA AGA TCC TGC   2520
826   Ser Pro Asp Pro Gln Ala Asp Gln Val Gln Met Pro Arg Ser Cys   840

2521   CTC TGG TGA
841   Leu Trp End

```

FIGURA 6 - SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENE E DA PROTEÍNA ADAM33. Esta figura destaca em verde a região do *primer* forward do fragmento a ser clonado e em amarelo a região do *primer* reverso. Em vermelho está destacada a metionina no início da proteína e em rosa o final da proteína traduzida, que contém 813 aminoácidos.

A figura 7, abaixo, está ilustrando a proteína ADAM33 com todos os seus domínios, em seguida, será demonstrado apenas os domínios envolvidos no presente trabalho.

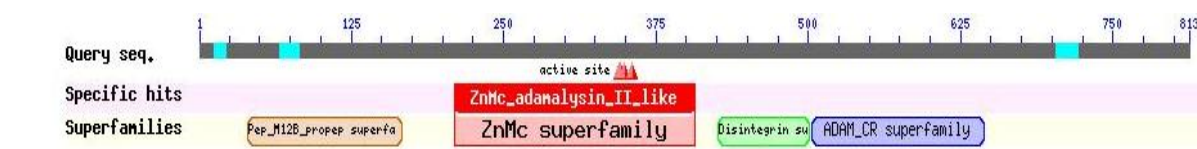


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA ADAM33 COMPLETA. Está destacado em laranja o pré-domínio, em vermelho do domínio catalítico que contém zinco, em verde o domínio disintegrina e em azul o domínio rico em cisteínas.
FONTE: Conserved Domains.

Os domínios a serem clonados foram identificados pelo programa Conserved Domains, tratando-se da porção final do domínio disintegrina e o domínio rico em cisteínas, representados na figura 8.

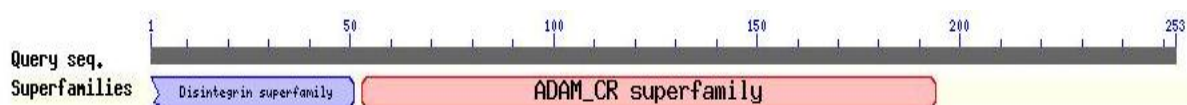


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS CLONADOS DA PROTEÍNA ADAM33. Representação dos domínios que foram clonados e expressados. Em azul a porção final do domínio disintegrina e em rosa todo o domínio rico em cisteínas.

FONTE: Conserved Domains.

5.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *ADAM33*

Após escolhida a região do gene que codifica para a proteína ADAM33, foi realizada sua amplificação através da técnica de PCR utilizando cDNA de mama normal e o resultado pode ser visualizado na figura 9 abaixo mostrando o fragmento esperado de 611 pb.

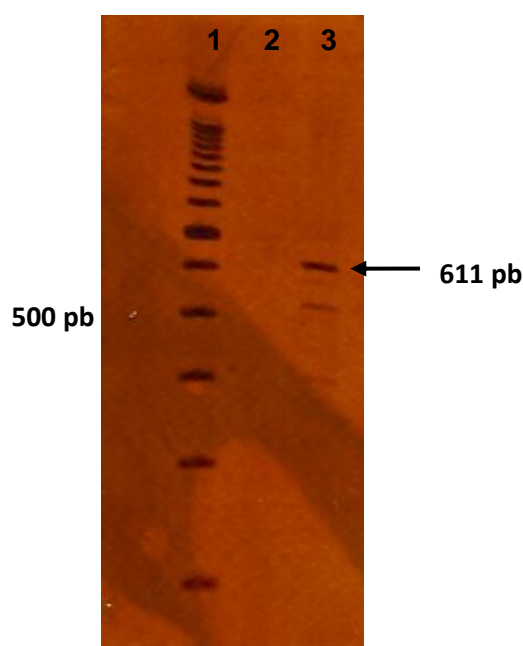


FIGURA 9 - PRODUTO DE PCR AMPLIFICADO DO GENE *ADAM33*. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. 1. Marcador de massa 100bp, 2. Controle negativo (PCR sem DNA). 3. Fragmento da reação de amplificação de DNA.

FONTE: O autor.

Após a comprovação da banda esperada contendo 611 pb, o produto foi aplicado em gel de agarose purificado e quantificado. O fragmento purificado pode ser visualizado na figura 10.

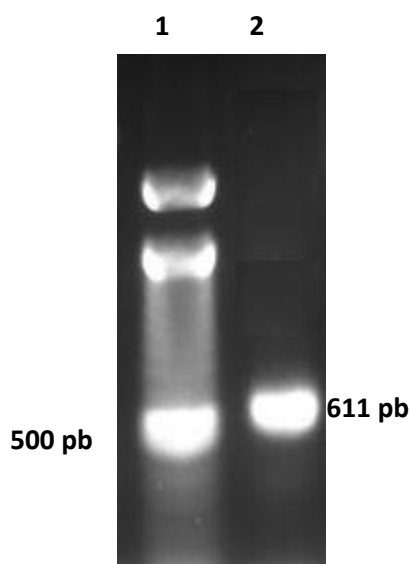


FIGURA 10 - PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR. Na linha 1 está o marcador de massa 100bp, onde esta indicado a posição da banda de 500 pb, na linha 2 o fragmento de 611 pb após a purificação.

FONTE: O autor.

Em seguida, aproximadamente 100 ng do produto de PCR foi ligado no vetor pGEMT[®]easy e o produto foi transformado em estirpe de *E. coli* DH10B por eletroporação como já descrito anteriormente. A presença do inserto foi verificada por amplificação de DNA das colônias utilizando os iniciadores específicos do fragmento clonado, que pode ser visualizado na figura 11 abaixo:

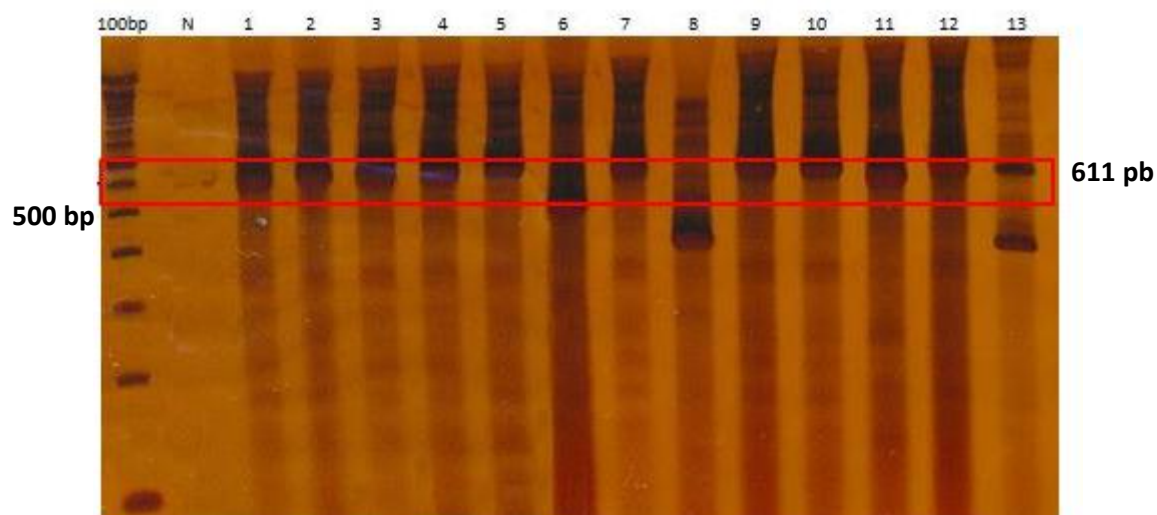


FIGURA 11 - PCR DAS COLÔNIAS A PARTIR DOS CLONES OBTIDOS. O marcador de massa usado 100bp, em seguida o controle negativo da reação, os clones obtidos : com o inserto da ADAM33 destacado pelo quadro vermelho (1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 e 12) e sem o inserto (5, 6, 8, 11 e 13).

FONTE: O autor.

A partir desse resultado os clones que continham o inserto de 611 pb (clones: 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 e o 12) foram selecionados para a extração do DNA plasmidial.

5.3 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DOS CLONES

As colônias contendo o inserto de tamanho adequado foram crescidas em meio LB e utilizadas para purificação dos plasmídeos utilizando o protocolo da Qiagen conforme especificações do fabricante, o resultado pode ser visualizado na Figura 12.

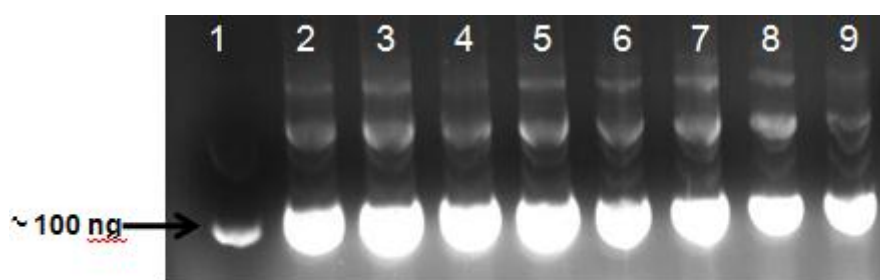


FIGURA 12 - EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS CLONES OBTIDOS. 1. MM pGEM ~100ng, 2-9. Clones positivos para o PCR de colônia e o perfil eletroforético de extração de DNA. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

FONTE: O autor.

Após a purificação do pGEM[®]Teasy contendo o inserto, foi realizada a reação de sequenciamento de 4 clones para se verificar a fase de leitura da proteína e se ocorreu alguma mutação na reação de PCR. Todos os clones estavam adequados, e o clone 04 que passou a ser denominado pGM04 foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. A seguir, está o resultado do alinhamento entre a sequência da proteína ADAM33 e o resultado do sequenciamento do clone pGM04 (figura 13):

```

ADAM33          -----GATTACCTACTGGACGG 17
AD33_CL04       TCCGGGAATGCTCTGTCCGGCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTACCTACTGGACGG 60
                  *****

ADAM33          CTCACCCTGTGCCAGGGGCAGTGGCTACTGCTGGGATGGCGCATGTCCCACGCTGGAGCA 77
AD33_CL04       CTCACCCTGTGCCAGGGGCAGTGGCTACTGCTGGGATGGCGCATGTCCCACGCTGGAGCA 120
                  *****

```

```

ADAM33      GCAGTGCCAGCAGCTCTGGGGGCCTGGCTCCCACCCAGCTCCCGAGGCCTGTTTCCAGGT 137
AD33_CL04    GCAGTGCCAGCAGCTCTGGGGGCCTGGCTCCCACCCAGCTCCCGAGGCCTGTTTCCAGGT 180
*****

ADAM33      GGTGAAGTCTGCGGGAGATGCTCATGGAACTGCGGCCAGGACAGCGAGGGCCACTTCCT 197
AD33_CL04    GGTGAAGTCTGCGGGAGATGCTCATGGAACTGCGGCCAGGACAGCGAGGGCCACTTCCT 240
*****

ADAM33      GCCCTGTGCAGGGAGGGATGCCCTGTGTGGGAAGCTGCAGTGCCAGGGTGGAAAGCCCAG 257
AD33_CL04    GCCCTGTGCAGGGAGGGATGCCCTGTGTGGGAAGCTGCAGTGCCAGGGTGGAAAGCCCAG 300
*****

ADAM33      CCTGCTCGCACCCGCACATGGTGCCAGTGGACTCTACCGTTCACCTAGATGGCCAGGAAGT 317
AD33_CL04    CCTGCTCGCACCCGCACATGGTGCCAGTGGACTCTACCGTTCACCTAGATGGCCAGGAAGT 360
*****

ADAM33      GACTTGTCGGGGAGCCTTGGCACTCCCCAGTGGCCAGCTGGACCTGCTTGGCCTGGGCCT 377
AD33_CL04    GACTTGTCGGGGAGCCTTGGCACTCCCCAGTGGCCAGCTGGACCTGCTTGGCCTGGGCCT 420
*****

ADAM33      GGTAGAGCCAGGCACCCAGTGTGGACCTAGAATGGTGTGCCAGAGCAGGCGCTGCAGGA 436
AD33_CL04    GGTAGAGCCAGGCACCCAGTGTGGACCTAGAATGGTGTGCCAGAGCAGGCGCTGCAGGA 480
*****

ADAM33      AGAATGCCTTCCAGGAGCTTCAGCGCTGCCTGACTGCCTGCCACAGCCACGGGGTTTGCA 496
AD33_CL04    AGAATGCCTTCCAGGAGCTTCAGCGCTGCCTGACTGCCTGCCACAGCCACGGGGTTTGCA 540
*****

ADAM33      ATAGCAACCATAACTGCCACTGTGCTCCAGGCTGGGCTCCACCCTTCTGTGACAAGCCAG 556
AD33_CL04    ATAGCAACCATAACTGCCACTGTGCTCCAGGCTGGGCTCCACCCTTCTGTGACAAGCCAG 599
*****

ADAM33      GCTTTGGTGGCAGCATGGACAGTGGCCCTGTGCAGGCTGAAAACCATGACACCTTCCTGC 616
AD33_CL04    GCTTTGGTGGCAGCATG----- 616
*****

ADAM        ATCACTAGTGAATTC 631
AD33_CL04    -----

```

FIGURA 13 - ANÁLISE DE SEMELHANÇA PELO CLUSTALW DA SEQUÊNCIA DO GENE DA PROTEÍNA ADAM33 HUMANA (ADAM33) COM A SEQUÊNCIA RECOMBINANTE (AD33-CL04). O clone AD33_CL04 obtido apresentou a sequência idêntica quando comparado à sequência de referência.
FONTE: CLUSTALW.

5.4 SUBCLONAGEM DE PARTE DO GENE *ADAM33* NO VETOR DE EXPRESSÃO pET28a

Após a escolha do clone correto, foi feita a purificação do DNA plasmidial (pGM04) em grande escala, utilizando o protocolo da Qiagen (Midiprep) conforme especificações do fabricante.

O plasmídeo pGM04 e o vetor de expressão de proteína pET28a foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*. Esta enzima faz parte do sítio de policlonagem do vetor pET28a e flanqueia o inserto no vetor pGEMTeasy.

O produto da digestão do plasmídeo pGM04 foi aplicado em gel de agarose e o fragmento contendo 631 pb foi purificado. Os fragmentos após digestão e depois da purificação do gel podem ser visualizados na figura 14.

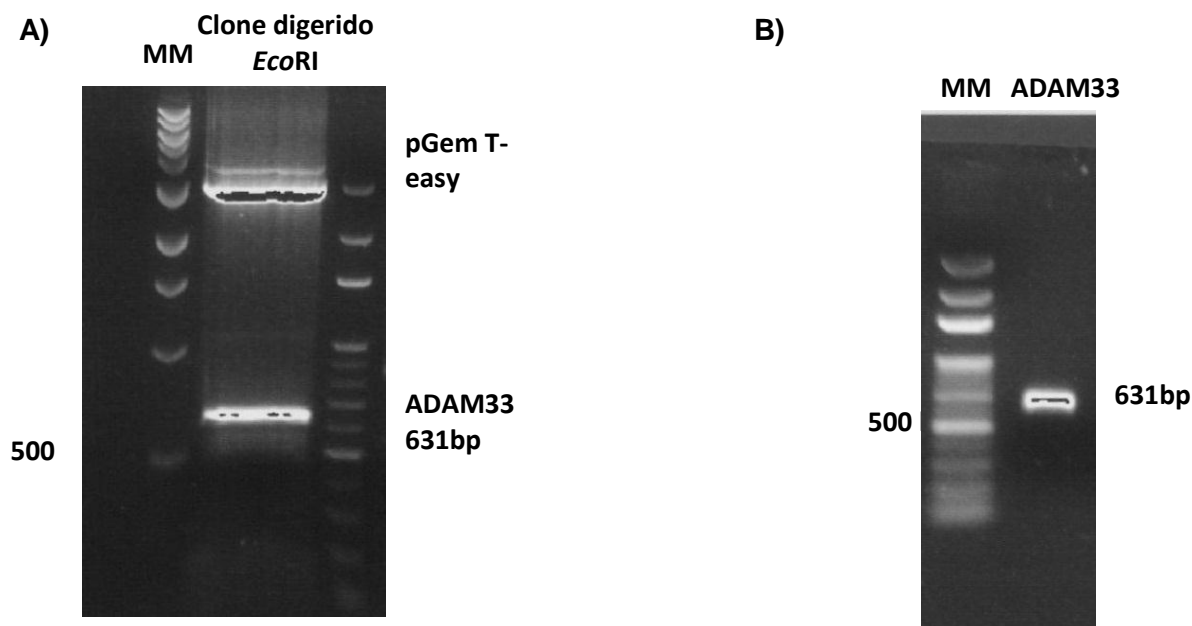


FIGURA 14 - DIGESTÃO DO CLONE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *ECORI* E O PRODUTO DA PURIFICAÇÃO. A) Pode-se ver o produto da digestão com *EcoRI*. B) O resultado do produto purificado do gel de agarose. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.
FONTE: O autor.

Após a digestão e purificação descrita anteriormente, o inserto que passou a ter 631 pb, foi ligado ao vetor de expressão de proteínas pET28a. O produto desta reação de ligação foi usado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH10B de *E. coli*. As colônias que cresceram em meio LA contendo os antibióticos para seleção foram usadas para confirmação da clonagem através de PCR de colônia.

Nessa etapa fez-se a seleção do clone recombinante que tivesse o inserto posicionada corretamente com relação à inserção da cauda de 6 histinas na porção N-terminal do domínio da proteína ADAM33. Para isso, após a seleção inicial com os iniciadores do fragmento foi feito um novo PCR das colônias por PCR utilizando o iniciador Universal que alinhava no vetor pET28a e o reverso no fragmento. O produto amplificado deveria conter 710 pb. A figura 15 mostra o PCR de colônia

contendo o fragmento de 710 pb e o DNA plasmidial após a digestão com *EcoRI*, DNA do plasmídeo recombinante entre pET28a e o fragmento do gene *ADAM33* que foi denominado pGM05.

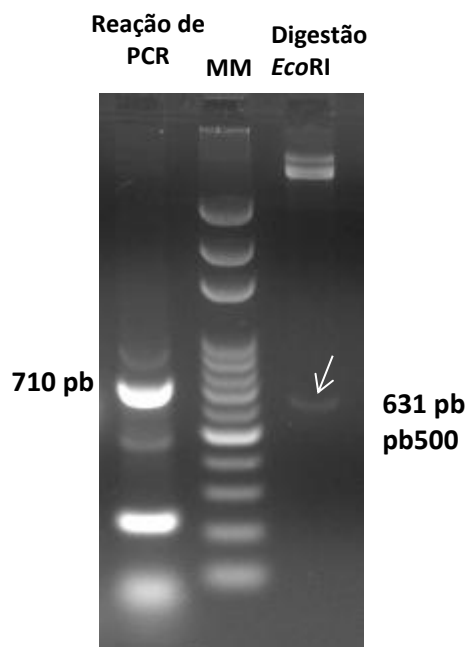


FIGURA 15 - PRODUTO DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA E DNA PLASMIDIAL DO PLASMÍDEO pGM05 DIGERIDO COM *EcoRI*. Observa-se o produto de amplificação por PCR de colônia, MM, é o marcador de massa molecular e em seguida o produto da digestão com o fragmento esperado contendo 631 pb.

FONTE: O autor.

O plasmídeo pGM05 selecionado na orientação correta foi submetido a reação de sequenciamento como já descrito anteriormente. Foi verificado que o fragmento subclonado continha todos as bases, sem mutações ou deleções, e encontrava-se em na fase de leitura correta para que então se pudesse iniciar a expressão da proteína alvo.

5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INDUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O vetor de expressão utilizado (pET28a) foi escolhido por possuir o promotor forte do bacteriófago T7, sendo possível obter uma alta taxa de expressão da

proteína de interesse após indução, além de codificar para seis resíduos de histidina que ficam localizados na região N-terminal da proteína de interesse. Esta sequência, denominada de cauda de histidina (His-tag), possibilita a purificação da proteína expressa em apenas um passo cromatográfico, utilizando cromatografia de afinidade entre os grupamentos imidazol da cauda His-tag ao níquel quelado a um suporte sólido, permitindo, desta forma, aumento da eficiência e do rendimento do processo.

A expressão dos domínios da proteína ADAM33 foi induzida em 3 diferentes estirpes de *E. coli* BL21, pLysS, Star e Ai. A estirpe BL21(λDE3) pLysS produz a RNA polimerase do fago T7 sob controle do promotor *lacUV5*. A indução do promotor *lacUV5* por IPTG ou lactose leva a expressão da RNA polimerase do fago T7, necessária para a expressão da proteína de interesse a partir do vetor pET28a. Esta estirpe carrega o vetor pLysS que codifica para uma lisozima específica para controle da quantidade de RNA polimerase do bacteriófago T7.

A BL21 Star (DE3) também produz a RNA polimerase do fago T7 sob controle do promotor *lacUV5*, sendo necessário IPTG para induzir a expressão. Esta estirpe oferece a estabilidade do RNAm melhorada devido a uma mutação no gene RNaseE (*rne131*), o que reduz os níveis de RNases endógenas, reduzindo a degradação do RNAm, aumentando assim a estabilidade dos transcritos de RNAm e o rendimento de proteína. A superexpressão em pequena escala da proteína ADAM33 com cauda His em *E. coli* BL21 : pLysS e Star foi realizada através da indução com IPTG 1 mM durante 4 horas a 37°C.

A estirpe de *E. coli* BL21 Ai contém uma inserção cromossomal do gene que codifica para RNA polimerase do fago T7 dentro do locus de *araB* do operon *araBAD*, sendo a regulação da T7 RNA polimerase controlada pelo promotor *araBAD*, e portanto induzida por L-arabinose e reprimida por glucose. Esta estirpe permite um maior controle de regulação da expressão da RNA polimerase, podendo contribuir com o aumento da solubilidade da proteína heteróloga ao permitir uma expressão homogênea.

O perfil de indução de proteínas nas 3 estirpes de BL21 estudadas pode ser verificado na figura 16. Este resultado mostra que as estirpes de *E. coli* BL21 pLysS, Star e Ai não expressam nenhuma proteína com tamanho similar ao esperado de 27,7 kDa na ausência de transformação com o plasmídeo pGM05 (sem vetor). Entretanto, as estirpes pLys e Star foram capazes de expressar pequena

quantidade de uma proteína com tamanho aproximado de 27 kDa na ausência de indução. O mesmo não ocorreu com estirpe BL21 Ai (ver seta na figura 16). Este resultado mostra que o uso das linhagens que produzem a proteína alvo na ausência de indução poderão ter um baixo rendimento na indução em grande escala.

A expressão antecipada de proteína heteróloga geralmente leva a degradação e baixo rendimento de proteínas para purificação além da toxicidade a bactéria hospedeira. Quando as estirpes foram submetidas à condição de indução foi observado que todas foram capazes de expressar uma proteína de aproximadamente 27,7 kDa (proteína recombinante acrescentada dos aminoácidos do vetor). No entanto, a estirpe BL21 Ai expressa essa proteína em uma quantidade maior. Isso pode ser em decorrência da expressão ocorrer apenas no momento da presença dos indutores.

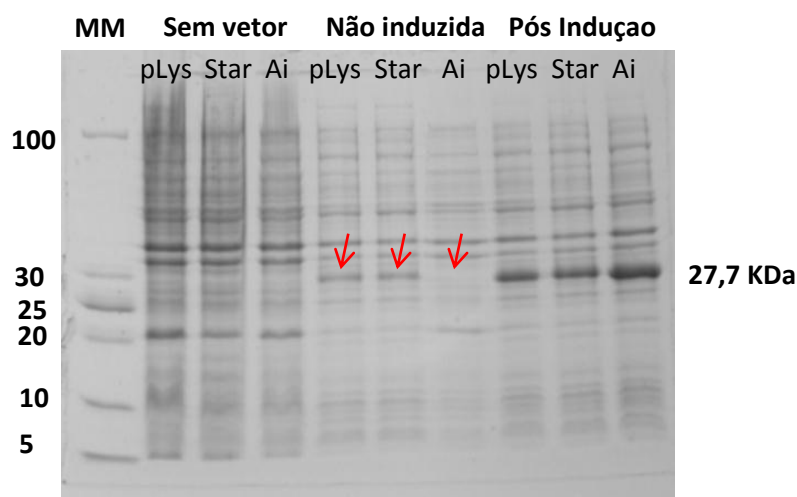


FIGURA 16 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *E. COLI* BL21 pLYSS, STAR E AI. Pode-se observar o marcador de massa molecular de proteínas com as massas em kDa(MW). A seguir são mostradas as estirpes de 3 em 3 : as estirpes pLysS, Star e Ai sem vetor seguido das 3 estirpes transformadas antes da adição dos indutores e após a adição dos indutores. FONTE: O autor.

Diante desses resultados, foi decidido utilizar somente a estirpe BL21 Ai para expressão de proteínas devido ao maior controle sobre a expressão da proteína recombinante (não houve expressão na ausência do indutor) e, também, um possível melhor rendimento que foi realmente constatado nos experimentos posteriores.

A fim de determinar se a proteína de aproximadamente 27 kDa poderia ser a proteína recombinante ADAM33, foi realizado experimento de imunodeteção de proteínas (western blot) utilizando nesse momento o anticorpo anti His-Tag como anticorpo primário. A figura 17 mostra os extratos bacterianos da estirpe BL21 Ai (pGM05) não induzido e induzido. Pode-se observar a presença da banda de 27,7 kDa o que indica que a proteína observada anteriormente no extrato bruto de células foi confirmada como sendo a proteína ADAM33 recombinante.

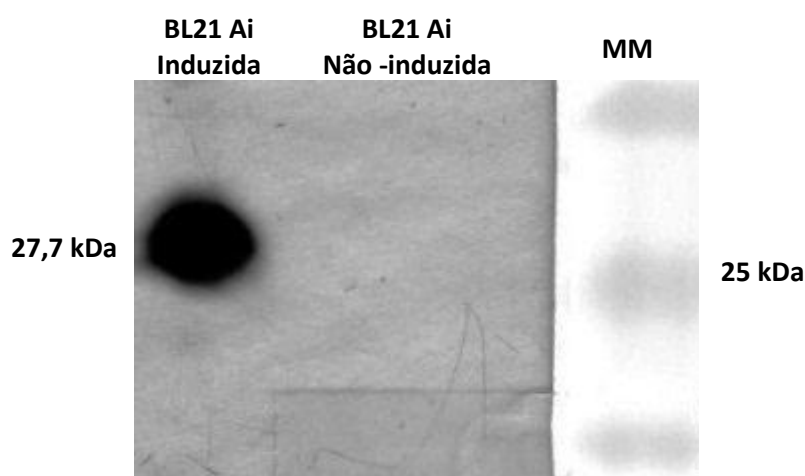


FIGURA 17 - IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM O ANTICORPO ANTI HIS –TAG. O western blot foi realizado com os extratos bacterianos da estirpe BL21 Ai (pGM05) induzido e não induzido. Pode-se observar a presença da banda de 27,7 kDa como sendo a proteína ADAM33 recombinante fusionada a cauda His-Tag.

FONTE: O autor.

Para que fosse possível o planejamento de experimentos funcionais da proteína recombinante, foi testada a solubilidade da mesma. A solubilidade da proteína foi testada após o uso de tampões com variação da concentração de NaCl, na presença de guanidina ou uréia. Após a indução, a cultura bacteriana foi concentrada e sonicada com os diferentes tampões, para a análise da presença da proteína recombinante nas frações solúvel e insolúvel do lisado bacteriano como pode ser visto na figura 18.

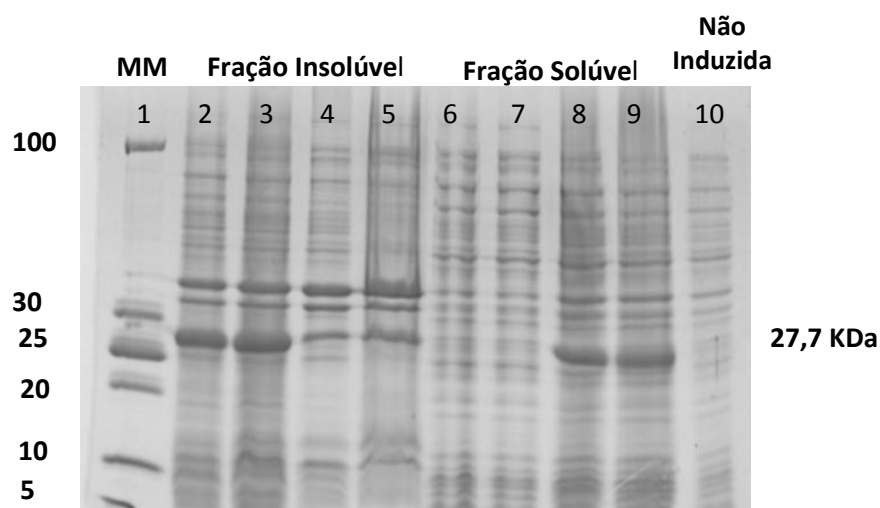


FIGURA 18 - CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *E. COLI* BL21 AI. (1) marcador de massa molecular de proteínas com as massas em kDa, Frações insolúveis: (2) baixa concentração de NaCl 50 mM, (3) elevada concentração de NaCl 500 mM, (4) tampão contendo ureia 8 M e (5) tampão contendo guanidina 8 M. Frações solúveis: (6) baixa concentração de NaCl, (7) elevada concentração de NaCl, (8) tampão contendo uréia 8 M e (9) tampão contendo guanidina 8 M. (10) BL21Ai (pGM05) não induzida. FONTE: O autor.

O experimento de solubilidade mostrou que a proteína recombinante apresenta-se em maior quantidade na fração insolúvel na presença de baixa (50 mM) ou alta (500 mM) concentração de NaCl. A pouca solubilização da proteína foi confirmada por sua presença na fração solúvel em que foi acrescentado guanidina e, também, na fração com uréia (ambas 8 M).

A proteína recombinante contendo o domínio rico em cisteínas apresentou uma purificação satisfatória, porém uma pequena quantidade destes domínios pôde ser purificada na forma solúvel e, praticamente toda proteína recombinante permaneceu na fração insolúvel do lisado. A estirpe bacteriana e as condições de cultivo e indução produzem a proteína recombinante em aglomerados lipídicos que se chamam corpos de inclusão e que são insolúveis quando se utiliza apenas a lise mecânica da célula bacteriana. Nestes casos, é necessário usar metodologias que evitem a formação de corpos de inclusão, através da diminuição dos níveis de expressão ou realizar procedimentos que solubilizem estes corpos de inclusão após a expressão (SAMBROOK *et al.*, 2001). Por essa razão, foi testado o crescimento seguido de indução bacteriana a 30°C. Porém após diversas tentativas não foi observado crescimento bacteriano satisfatório. Provavelmente nessas condições a presença do plasmídeo prejudica o crescimento dessa estirpe de bactéria. Como resultados em paralelo se mostraram satisfatórios no rendimento e solubilidade da

proteína recombinante (mostrados a seguir) as tentativas de tornar a proteína expressa sem corpos de inclusão foram descartadas.

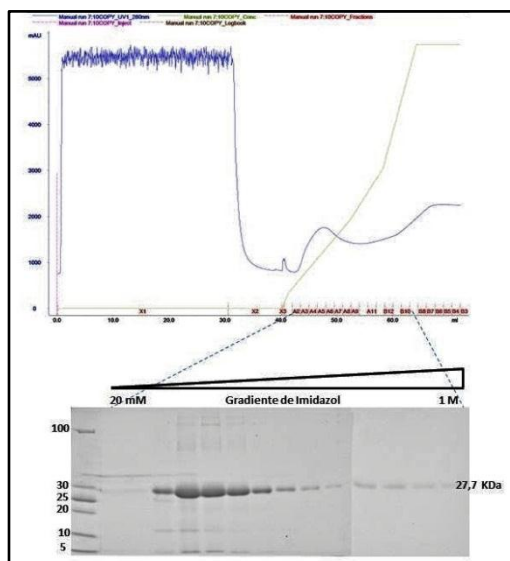
Após estabelecidas as condições ideais de obtenção da proteína ADAM33 recombinante, partimos para a etapa de purificação. Foram testadas diferentes formas de purificação com variação de volumes de culturas induzidas, número de colunas acopladas e o volume de tampão contendo imidazol para eluir a proteína recombinante His-Tag da coluna.

Como já descrito anteriormente, a proteína ADAM33 fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal foi purificada usando coluna HiTrap Chelating-Ni⁺² (GE Healthcare), acoplada ao cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare). Para cada purificação induzimos um volume que variou de 100 mL ou 200 mL de cultura de BL21Ai transformadas. A purificação foi feita inicialmente usando 2 colunas de 1 mL acopladas, em seguida, optamos por usar apenas uma coluna de 1 mL. As diferentes formas de purificação estão representadas na figura 19.

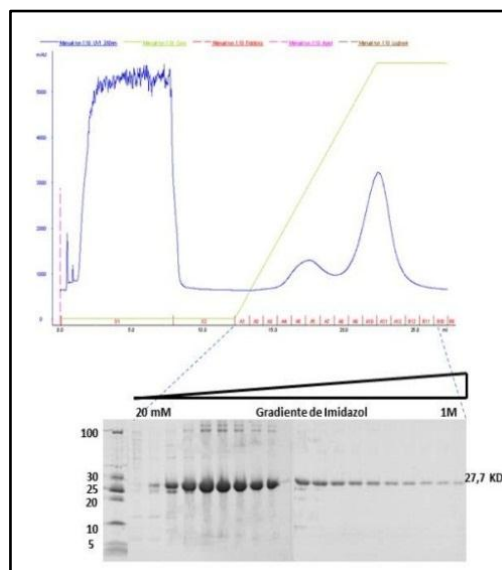
Na figura 19(A) a purificação ocorreu a partir de um volume 100 mL de cultura usando 2 colunas de 1mL HiTrap Chelating-Ni⁺² acopladas, no entanto, a proteína foi eluída diluída em várias frações. Em 19(B) a purificação partiu de um volume de 200 mL de cultura usando também 2 colunas e como demonstrado a proteína também ficou diluída em várias frações. Em 19(C) a purificação partiu de um volume de 200 mL de cultura usando 1 coluna de 1 mL, nessa situação a proteína ficou muito concentrada e precipitou após a eluição. Finalmente em 19(D) com a purificação partindo de um volume de 100 mL de cultura usando 1 coluna de 1mL, a purificação ficou adequada, obtendo em poucas frações uma concentração alta de proteína que não estava precipitada.

Foram coletadas alíquotas de 1 mL e amostras de 10 µL das frações obtidas e correspondentes ao pico no cromatograma foram coletadas para análise em gel SDS-PAGE. As frações que apresentaram maior pureza e concentração foram reunidas e dialisadas contra 4 vezes de 1 L de solução de diálise contendo: 50 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl e 10% glicerol pH 8,0. A diálise foi realizada a temperatura de 4°C por 48 horas.

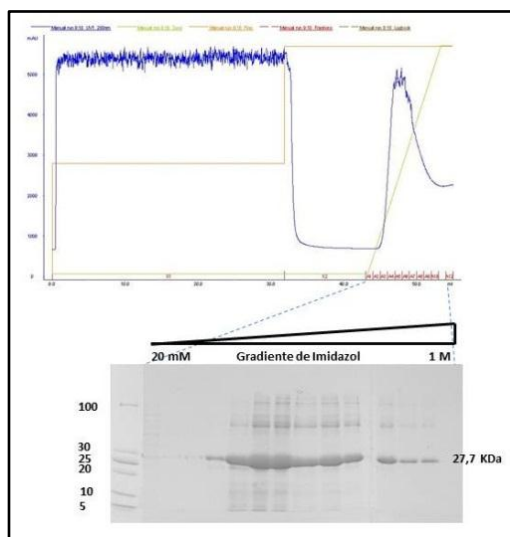
A)



B)



C)



D)

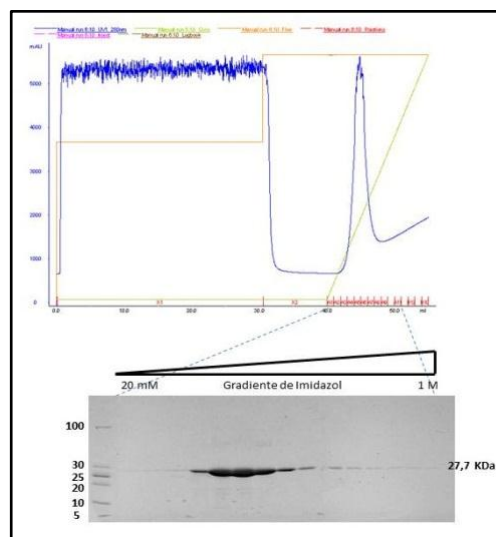


FIGURA 19 - GRÁFICOS DOS PRODUTOS DE PURIFICAÇÃO E PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS. Em todos os quadros a parte de cima mostra o gráfico obtido do software do Akta e abaixo o gel SDS-PAGE das frações de proteínas eluídas. (A) Purificação usando 2 colunas de 1mL HiTrap Chelating- Ni^{+2} , que resultou na proteína eluída em várias frações. (B) Purificação de um volume total de 200 mL de cultura usando 2 colunas, nessa situação a proteína também ficou diluída. (C) Purificação de um volume total de 200 mL de cultura usando 1 coluna de 1 mL, nessa situação a proteína ficou muito concentrada e precipitou. (D) Purificação de um volume total de 100 mL de cultura usando 1 coluna de 1mL, a purificação ficou adequada, em poucas frações e não precipitada.
FONTE: O autor.

Após as diálises, foi determinada a concentração proteica das amostras, utilizando o método de Bradford como descrito anteriormente.

Nas duas primeiras purificações, onde a proteína ficou diluída em várias alíquotas, após a diálise, a proteína foi concentrada, através de diálise, usando polietilenoglicol (PEG) de peso molecular 8000 (sólido a temperatura ambiente). Esse procedimento foi realizado adicionando o PEG sobre a membrana e removendo-o quando este estava encharcado, até o volume que considerássemos ideal.

O procedimento para concentrar a proteína foi necessário, pois, um dos objetivos da produção da proteína ADAM33 recombinante era imunização de camundongos Balb/c para obtenção de anticorpos policlonais e monoclonais. Como esses animais são de pequeno porte, o volume a aplicado deve ser o menor possível, cerca de 100 μL . Assim, após concentrar com PEG 8000, o volume tornou-se menor.

O rendimento das proteínas purificadas pode ser visto no quadro 2. O rendimento obtido na primeira purificação foi de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após a concentração utilizando PEG 8000 o rendimento aumentou 8 vezes passando para 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Na segunda purificação o rendimento foi de 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aumentando quatro vezes após a concentração (4,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Na terceira e ultima purificação o rendimento foi de 3,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 2,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente, e não foi feita a concentração com PEG 8000 (Quadro 2).

Concentração da Proteína Purificações	Concentração da proteína após a purificação ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentração da proteína após PEG 8000 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Primeira	0,2	1,6
Segunda	0,9	4,1
Terceira	3,4	Não realizado
Quarta	2,2	Não realizado

QUADRO 2 – CONCENTRAÇÃO PROTEÍNA OBTIDA APÓS AS PURIFICAÇÕES DA PROTEÍNA ADAM33 RECOMBINANTE E APÓS O TRATAMENTO COM PEG 8000.
FONTE: O autor.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI ADAM33

Quatro camundongos Balb/c, denominados C0, C1, C2 e C3 foram imunizados com a proteína recombinante ADAM33. O soro dos animais imunizados foi coletado quatorze dias após a última imunização e a reatividade destes soros foi testada através de ensaios de ELISA, western blot e imunohistoquímica. Os quatro soros policlonais tiveram igual reatividade quando analisados por ELISA e western blot.

Os soros policlonais foram testados por ELISA, utilizando placas sensibilizadas com a proteína ADAM33 recombinante purificada. Adotou-se como valor base para positividade do teste de ELISA o valor duas vezes maior que o controle negativo, representado pelo título do soro do camundongo não imunizado ou pré-imune. Os títulos de anticorpos séricos anti-ADAM33 dos camundongos imunizados podem ser observados na Figura 20.

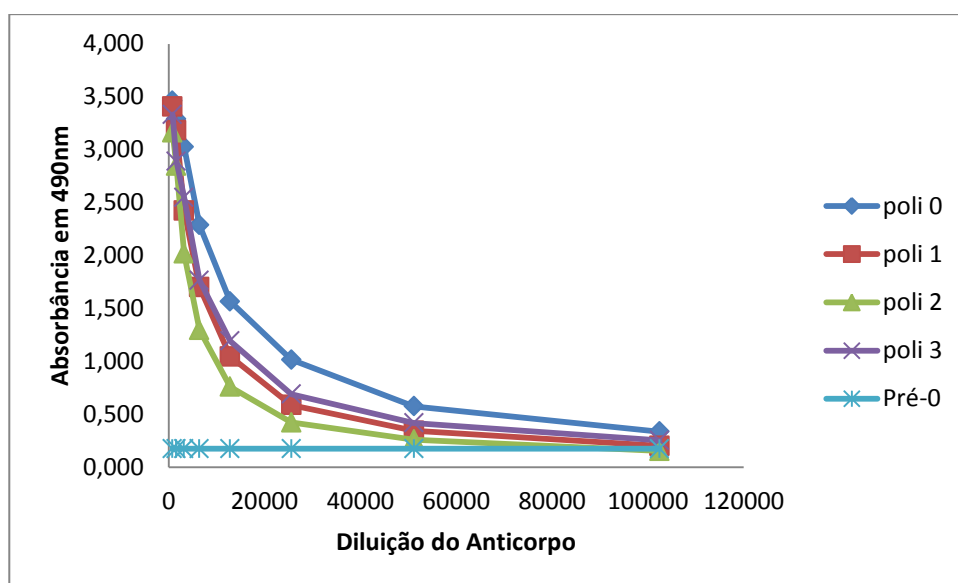


FIGURA 20 - TITULAÇÃO DOS SOROS DOS 4 ANIMAIS POR ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPO. Uma alíquota de 0,1 µg de proteína recombinante ADAM33 foi adsorvida em cada poço. Após a adsorção, os poços foram lavados e bloqueados com caseína. Então, o soro dos animais, assim como, seu respectivo soro pré-imune foi submetido à diluição seriada iniciando na diluição de 1: 800 até chegar em 1:102.400. Absorbância foi lida em 490 nm. Observa-se uma alta absorbância proveniente da reação dos anticorpos provenientes dos soros imunes. Reação não observada quando empregado os soros pré-ímenes dos camundongos. Está representado apenas um soro pré-imune, pois, os 4 obtiveram valores próximos de absorbância.

Os resultados mostram que o título de anticorpos apresentou absorvância próximo à 1, em 490 nm, na diluição de 1:25.600. Este título apresentou leitura de absorvância duas vezes acima do branco até 1:102.400. Tendo isso em vista podemos concluir que a quantidade de anticorpo policlonal seria suficiente para produzir um sinal no ensaio subsequente de imunohistoquímica. Mesmo com o título elevado observado o ensaio de imunohistoquímica foi feito na diluição 1:250.

A fim de se avaliar a especificidade do soro para a proteína ADAM33 foi realizado o experimento de western blot. O soro do camundongo C3 foi capaz de reconhecer proteína recombinante no extrato bacteriano e também a proteína purificada no western blot (Figura 21).

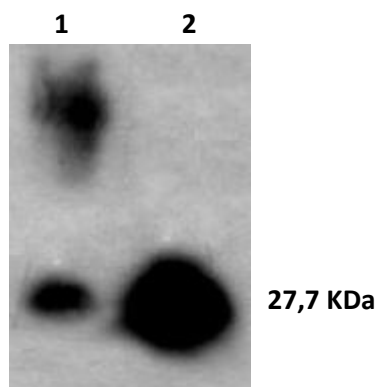


FIGURA 21 - TESTE DO SORO DO ANIMAL C3 POR WESTERN BLOTTING. O western blot foi realizado com os extratos bacterianos da estirpe BL21 Ai (pGM05) induzido (1) e 25 ng de proteína recombinante purificada(2), pode-se observar a presença da banda de 27,7 kDa como sendo a proteína ADAM33 recombinante. A membrana foi incubada com o soro policlonal do animal imunizado (C3) na diluição de 1: 10.000.

Este resultado mostrou que o soro policlonal produzido além de apresentar uma boa quantidade possui também qualidade. Pode-se observar que o soro foi capaz de reagir com proteínas do extrato bruto de bactérias induzidas. Este resultado era esperado, então, para saber se essa interação poderia ocorrer também nos ensaios de imunohistoquímica subsequentes foi feito experimento de western blot com extrato de células tumorais de mama que expressam ou não a proteína ADAM33.

Para este ensaio utilizamos como referência o trabalho desenvolvido anteriormente em nosso laboratório por Seniski et al., (2009), que demonstrou a expressão da proteína ADAM33 em linhagens tumorais de mama. Os resultados citados nesse trabalho mostraram que 13 das 20 linhagens, ou seja, 65% das

linhagens tumorais de mama não apresentam expressão do gene *ADAM33* quando comparadas com material obtido de mama normal. As linhagens MCF7 e PMC42 apresentaram expressão do gene *ADAM33* e linhagens como MDA-MB-231 se incluem nas linhagens sem expressão (SENISKI *et al.*, 2009).

Foram utilizadas duas linhagens com expressão da proteína como controle positivo MCF7 e PMC42 e como controle negativo MDA-MB-231. Para esse fim, as células foram cultivadas para se obter um extrato das proteínas totais das células, como já descrito. Como controle da reação foi feito em paralelo o western blot de uma proteína constitutiva celular (β -actina), ou seja, uma reação onde deve ser positiva para as três linhagens. Na figura 22 observa-se o resultado obtido.

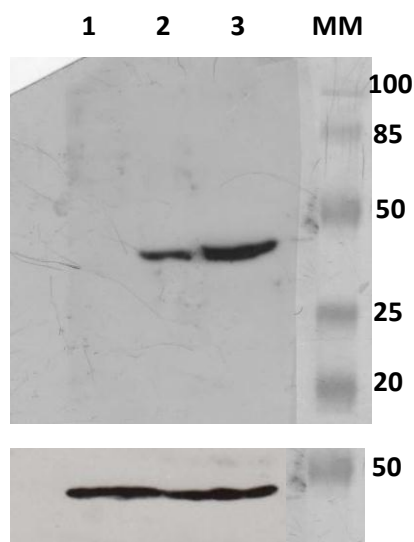


FIGURA 22 - WESTERN BLOT DA PROTEÍNA ADAM33 (ACIMA) E PROTEÍNA DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA β -ACTINA (ABAIXO) NAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. 1) MDA-MB-231, 2) MCF7, 3) PMC42, 4) marcador de massa molecular. O experimento foi repetido 3 vezes e sempre apresentou resultados semelhantes.

FONTE: O autor.

A linhagem MDA-MB-231 que não expressa o gene *ADAM33* não apresentou sinal com o soro policlonal anti ADAM33. Este resultado indica que o soro mesmo sendo policlonal possui boa especificidade. Além disso, esta linhagem expressa outras proteínas da família ADAM como as ADAM 9, 12, 15 e 17 (IBA *et al.*, 1999, O'SHEA *et al.* 2003, ZHENG *et al.*, 2009) e o fato de não ter sido detectado sinal, reforça a especificidade do soro policlonal que não apresentou reação cruzada para outras proteínas dessa família.

As duas linhagens que expressam o gene *ADAM33* apresentaram um sinal único de aproximadamente 37 kDa (valores determinados graficamente) indicando que o soro possui a capacidade de reconhecimento da proteína. O sinal gerado do extrato de células que expressam o gene *ADAM33* apresentou um valor diferente da proteína *ADAM33* íntegra que é de 120 kDa com o pró-domínio ou 100 kDa (GARLISI *et al.*, 2003). Garlisi *et al.*, (2003) observaram diferentes bandas correspondentes a proteína *ADAM33*, e correlacionaram essa observação com diferentes perfis de glicosilação da proteína e processamento pós-traducional. Observaram, também, que somente 10% da proteína íntegra é direcionada para o meio extracelular (GARLISI *et al.*, 2003; POWEL *et al.*, 2004).

Powell *et al.*, (2004) estudando vias aéreas em pulmão embrionário humano detectou, também, a expressão da proteína *ADAM33* com um tamanho aproximadamente 37 kDa. Esses autores descreveram que se trata do domínio rico em cisteínas, que pode ser expresso isoladamente nessas células devido processamento alternativo do RNAm. Não sabemos nesse momento porque as linhagens tumorais, MCF7 e PMC42, também, teriam esse perfil de expressão, e uma análise posterior sobre esse resultado esta sendo delineada.

5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA COM O ANTICORPO POLICLONAL ANTI *ADAM33*

Para a análise da especificidade do soro policlonal em tecido, foi realizado o ensaio de imunohistoquímica em tecido pulmonar e em carcinoma de mama.

Como a proteína *ADAM33* foi intensamente descrita no tecido pulmonar e bronquico, usamos como controle do anticorpo o tecido de pulmão. Pois, a *ADAM33* é expressa em células epiteliais brônquicas, células musculares e células mesenquimais do pulmão (HOLGATE *et al.*, 2005; HAITCHI *et al.*, 2005; Davies, 2009). Essa localização conhecida da proteína *ADAM33* pode ser usada como controle do local de expressão da proteína *ADAM33*, e assim, avaliarmos o anticorpo policlonal quanto a sua especificidade.

A)

B)

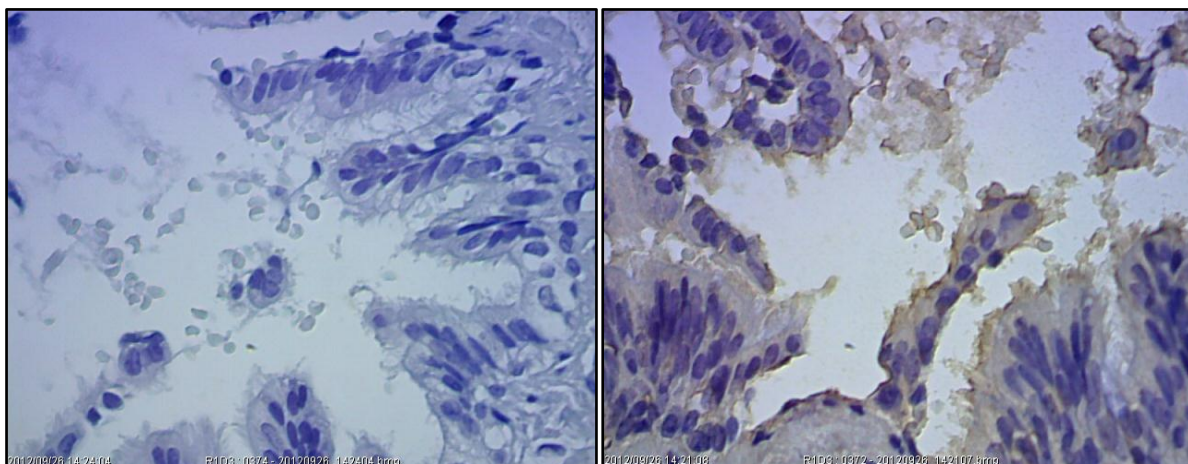


FIGURA 23 – IMUNOHISTOQUÍMICA DE PULMÃO. A) Controle negativo. B) Tecido pulmonar com Anti ADAM33, em aumento de 400 vezes.

FONTE: O autor.

A fotomicrografia de epitélio pulmonar apresentou-se com positividade apical de células epiteliais e células epiteliais descamadas. Positividade para membrana de células da musculatura lisa pulmonar. Sendo um resultado concordante com a literatura, quanto à positividade e localização da proteína ADAM33 em tecido pulmonar (HOLGATE *et al.*, 2005; HAITCHI *et al.*, 2005; Davies, 2009).

A imunohistoquímica de carcinoma de mama foi realizada utilizando um arranjo de tumores de mama (tissue micro array - TMA) (RAMOS *et al.*, 2012 em preparação). Esse TMA contém 11 amostras de carcinoma de mama (Quadro 3), sendo composto por 5 carcinomas ductais invasores e 9 carcinomas lobulares invasores. A análise subjetiva das lâminas foi feita pela médica patologista Dra Lucia de Noronha (UFPR). Todos os carcinomas ductais invasores apresentaram reatividade diante do soro policlonal. Na figura 24 está representado um desses tumores ductais.

A fotomicrografia (figura 24 B) demonstra infiltração por carcinoma ductal invasor composto por ductos mamários neoplásicos, irregulares, compostos por células apresentando atipias acentuadas, núcleos hipercromáticos e de cromatina grosseira, citoplasma amplo e de limites indistintos. Comparando com o controle negativo (figura 24 A) observa-se positividade citoplasmática e de membrana para o soro contendo anticorpo anti-ADAM33 nas células neoplásicas, evidenciada pela cor

castanha destas estruturas. Não há um bom reforço de membrana como seria o esperado. No entanto, há uma boa diferenciação e especificidade da reação para o meio intracelular, pois pode-se observar que a matriz extracelular desmoplásica fica evidentemente negativa. Nota-se ainda que o núcleo é claramente negativo como seria de se esperar. Portanto, podemos dizer que pela coloração castanha observada no citoplasma e na membrana comprovou-se a imunolocalização do anticorpo, observando-se especificidade, mesmo sendo um anticorpo policlonal.

O fraco sinal de membrana pode ser um indicativo das observações feitas por Garlisi *et al.* (2003) as quais demonstraram que somente 10% da proteína integra é direcionada para a membrana extracelular. Além disso, em um estudo recente de imunohistoquímica em aterosclerose mostra também que a maior reatividade de anticorpos anti-ADAM33 é observada no citoplasma (HOLLOWAY *et al.*, 2010). Yang e colaboradores (2012) também relatam que a maior parte da proteína está no citoplasma celular, demonstrado através de imunofluorescência, e ainda sugerem que estudos são necessários para compreender a distribuição dessa proteína.

Os carcinomas lobulares invasores apresentaram pouca reatividade de maneira geral, sendo que somente duas amostras foram positivas, com reatividade menor quando comparadas com os tumores ductais(Quadro 3). A figura 24 D, está mostrando um dos carcinomas lobulares que apresentaram fraca resposta ao anticorpo policlonal anti-ADAM33.

A fotomicrografia da Figura 24 C, controle negativo d carcinoma lobular invasor, mostra células neoplásicas atípicas arranjadas em agregados sólidos, com escassa matriz desmoplásica em permeio aos lóbulos neoplásicos.

A fotomicrografia dos carcinomas lobulares invasores (Figura 24 D) demonstra células neoplásicas atípicas arranjadas em fila indiana em meio ao estroma desmoplásico, aspecto característico de área de carcinoma lobular invasor. Observa-se negatividade citoplasmática para estas células atípicas, sendo o estroma e os núcleos neoplásicos evidentemente negativos. Observa-se positividade para citoplasma e membrana de células inflamatórias, portanto como já discutido para as linhagens tumorais usadas como controle, aqui também o soro policlonal apresentou especificidade.

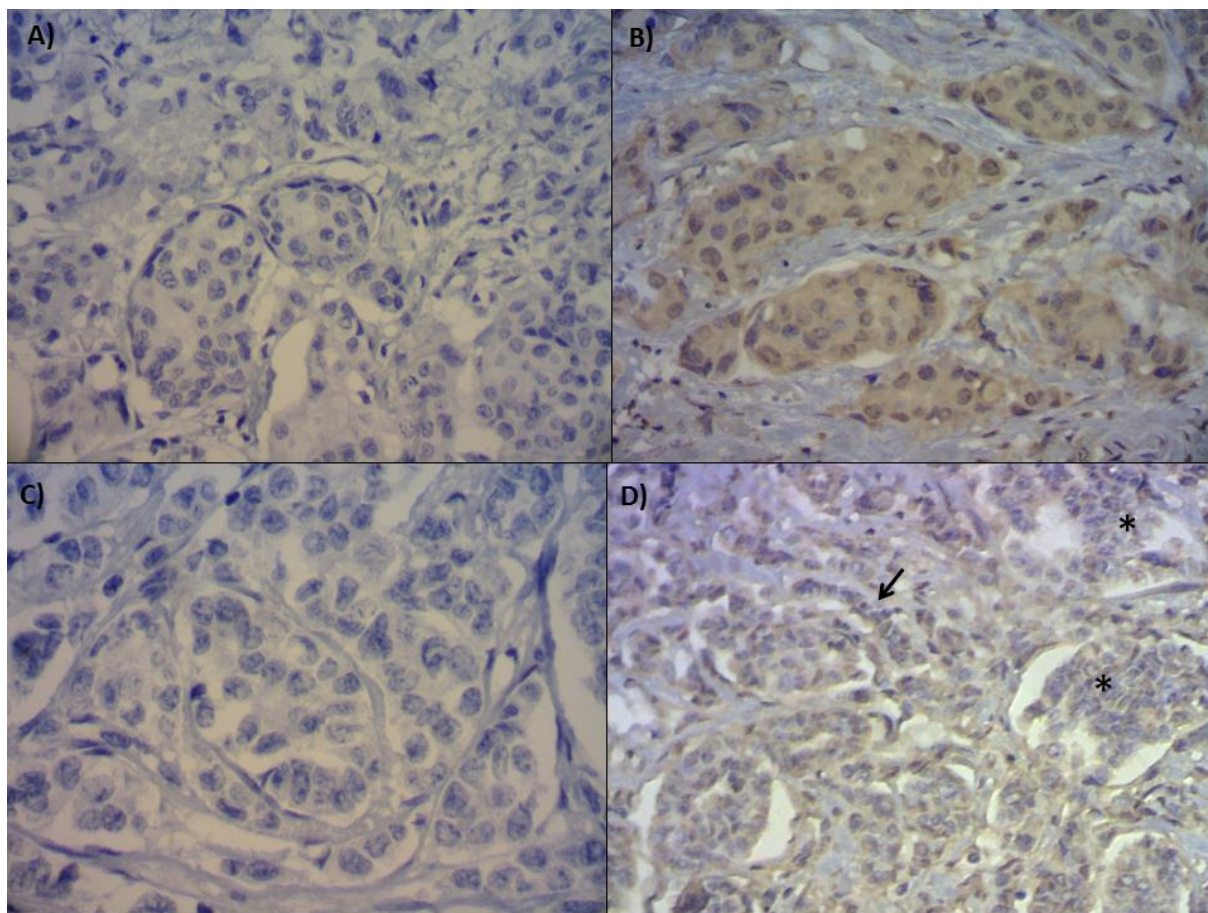


FIGURA24 – IMUNOHISTOQUÍMICA DE CARCINOMA DE MAMA COM O ANTICORPO POLICLONAL ANTI-ADAM33. A) Controle negativo do carcinoma ductal invasor. B) Carcinoma ductal invasor. C) Controle negativo do Carcinoma lobular invasor. D) Carcinoma lobular invasor, “Seta”: localização da estrutura de fila indiana, “*” localização de blocos desorganizados.

FONTE: O autor.

O TMA consistiu de 11 casos com idade das pacientes variando de 27 a 84 anos (Quadro 3).

As amostras apresentaram estádios I, II ou III. Entre os tipos tumorais, quatro foram IDCs (36%) e sete foram ILCs (67%). A análise por imunohistoquímica utilizou escores para demonstrar a intensidade de marcação, esses variaram entre 0, 1, 2 ou 3. Quatro amostras de IDC apresentaram escore 3. Entre os ILCs, das sete amostras, somente duas apresentaram escore 1 e, as outras cinco, apresentaram escore zero.

Caso	Idade	Estadio	Tipo	Escore da proteína ADAM33	Metilação do gene <i>ADAM33</i>
1	66	III	CDI	3	Neg
2	59	III	CDI	3	Neg
3	72	III	CDI	3	Neg
4	27	III	CDI	3	Neg
5	53	I	CLI	1	neg
6	55	II	CLI	1	neg
7	53	I	CLI	0	pos
8	84	I	CLI	0	pos
9	44	II	CLI	0	pos
10	42	II	CLI	0	pos
11	46	II	CLI	0	pos

QUADRO 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS 11 CASOS DE CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM A IDADE, ESTADIO, TIPO E ESTATUS DA EXPRESSÃO E METILAÇÃO DA ADAM33.

FONTE: O autor.

NOTA: * pos, positive e neg, negative.

Comparamos os resultados de imunohistoquímica com os resultados de hipermetilação do gene ADAM33 previamente publicados (SENISKI *et al.*, 2009). A metilação foi negativa em todos os IDCs, que apresentaram reação positiva para proteína ADAM33 por imunohistoquímica (escore 3). Em dois ILCs a metilação era negativa e a proteína ADAM33 apresentou escore 1 (Quadro 3). As outras 5 amostras tumorais ILCs que foram evidenciadas anteriormente como metiladas ou silenciadas apresentaram escore da proteína ADAM33 zero. Portanto, o status de metilação do promotor do gene *ADAM33* visto anteriormente, foi confirmado no ensaio de imunohistoquímica realizado com o soro policlonal anti ADAM33.

O resultado da imunohistoquímica demonstrou a possibilidade da utilização da proteína ADAM33 como biomarcador de carcinoma de mama mais especificamente do tipo lobular. Assim, na continuidade deste trabalho os animais imunizados serão utilizados para produção hibridomas, com produção de anticorpos monoclonais de alta especificidade. Com esta ferramenta disponível será possível analisar um grande número de tumores e implementar a sua utilização futura na prática clínica.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo podemos concluir que:

- Uma parte do gene ADAM33 contendo o domínio rico em cisteínas foi clonado em vetor pET28a e a proteína recombinante contendo domínio rico em cisteínas foi expressa e purificada em sistema procarionte utilizando *E. coli* BL21 Ai.
- A proteína recombinante foi purificada utilizando uréia, permaneceu solúvel após a diálise e foi reconhecida por anticorpo anti-His por imunodeteção.
- A imunização de animais com a proteína ADAM33 recombinante produziu soro policlonal com título de 1:25.600 capaz de reconhecer o extrato bruto de bactérias induzidas. Além disso o soro policlonal apresentou especificidade para a proteína ADAM33 expressa por linhagens tumorais que expressam o gene ADAM33.
- O soro policlonal possui anticorpos específicos para proteína ADAM33 endógena, em tecido pulmonar e carcinoma de mama do tipo ductal. A ausência de marcação positiva da proteína ADAM33 em amostras de carcinomas lobulares invasivos demonstra o potencial desta proteína como um biomarcador desse tipo específico de câncer de mama.

7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, V. P.; OSTROVNAYA, I.; SESHAN, V. E. et al. Clonal relatedness between lobular carcinoma in situ and synchronous malignant lesions. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 4, p. R103, 2012. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776144>>. Acesso em: 2/8/2012.

BANE, A. L.; TJAN, S.; PARKES, R. K.; ANDRULIS, I.; O'MALLEY, F. P. Invasive lobular carcinoma: to grade or not to grade. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 5, p. 621-8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605082>>. Acesso em: 24/7/2012.

BIGLIA, N.; MARIANI, L.; SGRO, L. et al. Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment. **Endocrine-related cancer**, v. 14, n. 3, p. 549-67, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914088>>. Acesso em: 2/8/2012.

CAKEBREAD, J. A.; HAITCHI, H.-M.; HOLLOWAY, J. W. et al. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. **Springer seminars in immunopathology**, v. 25, n. 3-4, p. 361-75, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999429>>. Acesso em: 27/7/2012.

CAO, A.-Y.; HUANG, L.; WU, J. et al. Tumor characteristics and the clinical outcome of invasive lobular carcinoma compared to infiltrating ductal carcinoma in a Chinese population. **World journal of surgical oncology**, v. 10, n. 1, p. 152, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805492>>. Acesso em: 2/8/2012.

CARCOFORO, P.; RAIJI, M.; LANGAN, R. Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast Presenting as Gastrointestinal Obstruction: A Mini Review. **Journal of Cancer of Cancer**, p. 11-15, 2012. Disponível em: <<http://jcancer.org/v03p0328.pdf>>. Acesso em: 6/8/2012.

DAVIES, D. E. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 6, n. 8, p. 678-82, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797070&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/7/2012.

DIJKSTRA, A.; POSTMA, D. S.; NOORDHOEK, J. A; et al. Expression of ADAMs ("a disintegrin and metalloprotease") in the human lung. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 454, n. 4, p. 441-9, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255780>>. Acesso em: 27/7/2012.

DUFFY, M. J.; MULLOOLY, M.; O'DONOVAN, N. et al. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? **Clinical proteomics**,

v. 8, n. 1, p. 9, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/7/2012.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular aspects of medicine**, v. 29, n. 5, p. 258-89, 2008. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762209>>. Acesso em: 15/7/2012.

EERDEWEGH, P. V.; LITTLE, R. D.; MASTRO, R. G. D. et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature**, v. 418, n. July, p. 426-430, 2002.

EROLE, P.; BOSCH, A.; ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 698-707, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178455>>. Acesso em: 18/7/2012.

ESWARAN, J.; CYANAM, D.; MUDVARI, P. et al. Transcriptomic landscape of breast cancers through mRNA sequencing. **Scientific reports**, v. 2, p. 264, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355776>>. Acesso em: 13/7/2012.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T. et al. Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin $\alpha_9\beta_1$. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17804-17810, 2002.

GARLISI, C. G.; ZOU, J.; DEVITO, K. E. et al. Human ADAM33: protein maturation and localization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 1, p. 35-43, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02029765>>. Acesso em: 12/7/2012.

GOMES, D. S.; BALABRAM, D.; PORTO, S. S.; GOBBI, H. Lobular neoplasia: frequency and association with other breast lesions. **Diagnostic pathology**, v. 6, n. 1, p. 74, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/8/2012.

GOWN, A. M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. **Modern pathology**, v. 21 Suppl 2, p. S8-S15, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437174>>. Acesso em: 1/8/2012.

GRAFF, J. R.; HERMAN, J. G.; LAPIDUS, R. G. et al. E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas. **Advances in Brief E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas**. **cancer research**, p. 5195-5199, 1995.

HAITCHI, H. M.; POWELL, ROBERT M; SHAW, T. J. et al. ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs. **American journal of respiratory**

and critical care medicine, v. 171, n. 9, p. 958-65, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709049>>. Acesso em: 16/7/2012.

HARIGOPAL, M.; SHIN, S. J.; MURRAY, M. P. et al. Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. **World journal of surgical oncology**, v. 3, p. 73, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1308872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/7/2012.

HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R. et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 25, n. 33, p. 5287-312, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17954709>>. Acesso em: 18/7/2012.

HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E.; POWELL, ROB M; HOLLOWAY, J. W. ADAM33: a newly identified gene in the pathogenesis of asthma. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 655-68, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257631>>. Acesso em: 27/7/2012.

HOLLOWAY, J. W.; LAXTON, R. C.; ROSE-ZERILLI, M. J. et al. ADAM33 expression in atherosclerotic lesions and relationship of ADAM33 gene variation with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 211, n. 1, p. 224-30, 2010. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227692>>. Acesso em: 29/7/2012.

HUANG, J.; BRIDGES, L. C.; WHITE, J. M. Selective Modulation of Integrin-mediated Cell Migration by Distinct ADAM Family Members □. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. October, p. 4982-4991, 2005.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. et al. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **The Journal of cell biology**, v. 149, n. 5, p. 1143-56, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 5, p. 1489-501, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

INCA. Estimativa 2012: Incidência de cancer no Brasil. ,2012.

KASHIWAGI, S.; YASHIRO, M.; TAKASHIMA, T. et al. Advantages of adjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer at Stage II: usefulness of prognostic markers E-cadherin and Ki67. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 6, p. R122, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3326564&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7/8/2012.

KEEN, J. C.; DAVIDSON, N. E. The biology of breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 3 Suppl, p. 825-33, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548582>>. Acesso em: 25/7/2012.

KIM, K.-E.; SONG, H.; HAHM, C. et al. Expression of ADAM33 is a novel regulatory mechanism in IL-18-secreted process in gastric cancer. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 6, p. 3548-55, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265133>>. Acesso em: 29/7/2012.

KRISTIANSEN, G.; PILARSKY, C. Molecular pathology of Invasive Lobular Breast Carcinoma. **Breast disease**, v. 30, p. 9-14, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850990>>. Acesso em: 25/7/2012.

LACROIX & LECLERCQ. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast cancer research and treatment**, v. 83, n. 3, p. 249-89, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758095>>. .

LEADER, J. E.; WANG, C.; FU, M.; PESTELL, R. G. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. **Biochemical pharmacology**, v. 72, p. 1589-1596, 2006.

LEE, J.-H. ET AL. Clinicopathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: a case control study. **World journal of surgical oncology**, v. 8, n. January 1984, p. 34, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LEONG, A. S.-Y.; ZHUANG, Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. **Pathobiology**, v. 78, n. 2, p. 99-114, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/8/2012.

LIU, ZE-JUN; ZHANG, XIAO-BING; ZHANG, Y.; YANG, X. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS**, v. 567, p. 327-332, 2004.

LOPEZ-GARCIA, M. A; GEYER, F. C.; LACROIX-TRIKI, M.; MARCHIÓ, C.; REIS-FILHO, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p. 171-92, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500230>>. Acesso em: 17/7/2012.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer science**, v. 98, n. 5, p. 621-8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17355265>>. Acesso em: 14/7/2012.

MOHAMMED, F. F.; SMOOKLER, D. S.; KHOKHA, R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62 Suppl 2, p. ii43-7, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1766743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 12, p. 929-41, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19005493>>. Acesso em: 15/7/2012.

NISHIZAKI, T.; CHEW, K.; CHU, L. et al. Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. **International journal of cancer**, v. 74, n. 5, p. 513-7, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9355973>>. .

ORTH, P.; REICHERT, P.; WANG, W. et al. Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human ADAM33. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 1, p. 129-137, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603013135>>. Acesso em: 26/7/2012.

O'SHEA, C.; MCKIE, N.; BUGGY, Y. et al. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 105, n. 6, p. 754-61, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767059>>. Acesso em: 21/8/2012.

POWELL, ROBERT M; WICKS, J.; HOLLOWAY, J. W.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 31, n. 1, p. 13-21, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742294>>. Acesso em: 23/7/2012.

PRASAD, K.; TIWARI, A.; ILANTHODI, S.; PRABHU, G.; PAI, M. Automation of immunohistochemical evaluation in breast cancer using image analysis. **World journal of clinical oncology**, v. 2, n. 4, p. 187-94, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3100486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/8/2012.

PUXEDDU, I.; PANG, Y. Y.; HARVEY, A. et al. The soluble form of a disintegrin and metalloprotease 33 promotes angiogenesis: implications for airway remodeling in asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 6, p. 1400-6, 1406.e1-4, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410963>>. Acesso em: 26/7/2012.

RAOUF, A.; SUN, Y.; CHATTERJEE, S.; BASAK, P. The biology of human breast epithelial progenitors. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 23, n. 5, p. 606-12, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609813>>. Acesso em: 23/7/2012.

REISS, K.; SAFTIG, P. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 2, p. 126-37, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049889>>. Acesso em: 15/7/2012.

RYU, D. W.; LEE, C. H. Impact of Serum HER2 Levels on Survival and Its Correlation with Clinicopathological Parameters in Women with Breast Cancer. **Journal of breast cancer**, v. 15, n. 1, p. 71-8, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3318178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & development**, v. 17, n. 1, p. 7-30, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514095>>. Acesso em: 15/7/2012.

SENISKI, G. G.; CAMARGO, A. A.; IERARDI, D. F. et al. ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC cancer**, v. 9, p. 80, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2660367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/7/2012.

SIMPSON, P. T.; REIS-FILHO, J. S.; GALE, T.; LAKHANI, S. R. Molecular evolution of breast cancer. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 2, p. 248-54, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641021>>. Acesso em: 25/7/2012.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BURKADZE, G.; KOLAR, Z. Mammary gland development and cancer. *Ceskoslovenská patologie*, v. 41, n. 3, p. 94-101, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16161454>>.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BAUMFORTH, K. et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. **BMC cancer**, v. 7, p. 55, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/7/2012.

VALLEJOS, C. S.; GÓMEZ, H. L.; CRUZ, W. R. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. **Clinical breast cancer**, v. 10, n. 4, p. 294-300, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705562>>. Acesso em: 17/7/2012.

VIANI, G. A.; AFONSO, S. L.; STEFANO, E. J.; DE FENDI, L. I.; SOARES, F. V. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. **BMC cancer**, v. 7, p. 153, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1959236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/7/2012.

VIRNIG, B. A.; SHAMLIYAN, T.; TUTTLE, T. M.; KANE, R. L.; WILT, T. J. Diagnosis and management of ductal carcinoma in situ (DCIS). **Evidence report/technology assessment**, v. 185, n. 185, p. 1-549, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629475>>. .

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular oncology**, v. 4, n. 3, p. 192-208, 2010. Elsevier

B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452298>>. Acesso em: 26/7/2012.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056258>>. Acesso em: 19/7/2012.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 598-606, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067403001108>>. Acesso em: 15/7/2012.

WOLFSBERG ET AL. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin _And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, 1995.

YANG, Y.; WICKS, J.; HAITCHI, H. M. et al. Regulation of a disintegrin and metalloprotease-33 expression by transforming growth factor- β . **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 46, n. 5, p. 633-40, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227561>>. Acesso em: 7/8/2012.

YODER, B. J.; WILKINSON, E. J.; MASSOLL, N. A. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. **The breast journal**, v. 13, n. 2, p. 172-9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319859>>. .

ZHENG, X.; JIANG, F.; KATAKOWSKI, M. et al. ADAM17. , v. 8, n. 11, p. 1045-1054, 2009.

ZIGRINO, P.; STEIGER, J.; FOX, J. W. et al. Role of ADAM-9 Disintegrin-Cysteine-rich Domains in Human Keratinocyte Migration *. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30785-30793, 2007.